

「光エネルギーと物質変換」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成25年度終了研究課題－

研究総括 井上 晴夫

1. 研究領域の概要

本研究領域では、人類にとって理想的なエネルギー源である太陽光による広義の物質変換を介して、光エネルギーを化学エネルギーに変換・貯蔵・有効利用し得る高効率システムの構築を目指した独創的で挑戦的な研究を対象とした。具体的には、半導体触媒や有機金属錯体による光水素発生、二酸化炭素の光還元、高効率な光捕集・電子移動・電荷分離・電子リレー系、光化学反応場の制御、水分子を組み込んだ酸化還元系、ナノテクノロジーを駆使した光電変換材料、高効率光合成能を有する植物、藻類、菌類などの利用技術、光を利用したバイオマスからのエネルギー生産、光合成メカニズムの解明などが含まれる。光化学、有機化学、材料科学、ナノテクノロジー、バイオテクノロジーなど幅広い分野から、将来のエネルギーシステムへの展開を目指した革新的技術に新しい発想で挑戦する研究を対象とした。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 9件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「光エネルギーと物質変換」領域の領域アドバイザー11名の協力を得て、最終的には研究総括が行った。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info666/shiryoku4.html>)の他、将来のエネルギーシステムへの展開を目指した革新的技術に新しい発想で挑戦する研究を重視した。
- 4) 審査に当たっては、これまでの研究実績というよりは研究者の個性「ひと」を重視した。提案の新規性、独創性はもちろん研究計画の発展性に加え、これまでに蓄積された科学技術やその組み合わせを超えて、将来のエネルギー問題解決のブレークスルーとなる可能性を秘めた挑戦的な研究提案を特に重視し、できるだけ多面的な評価を心がけ選考した。また、研究提案の利害関係者の関与を避け、他制度による助成状況等も留意し、公平厳正な審査を行った。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ1課題を推薦した。

| 選考 | 書類選考 | 面接選考 | 採択数 | | |
|-----|------|------|-----|----|-----|
| | | | 12件 | 内訳 | 3年型 |
| 対象数 | 115件 | 33件 | | | 12件 |

()内は大挑戦型としての採択数。

備考:

- 1)平成22年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・杉浦美羽研究者、船橋靖博研究者、山崎仁丈研究者

研究期間が5年で、今年度終了しないため。今年度は中間評価を実施する(中間評価結果:
<http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/mid-term/index.html>.)

・栗栖源嗣研究者



最先端・次世代研究開発支援プログラムに採択され、研究を中断したため。

5. 研究実施期間

平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月(3 年型)

6. 領域の活動状況

領域会議: 8 回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 13 箇所

7. 事後評価の手続き

別記9名の研究者には、個別ディスカッションの機会を設け、研究の進捗状況、現在の課題、今後の方針・展望などについて、研究総括、領域アドバイザーとの十分な質疑応答を行い、課題の解決や研究の進め方に対する助言・指導を行った。さらに評価会(領域会議等)において個別ディスカッションでの意見をふまえたその後の研究進展などについて、研究総括、領域アドバイザー、研究者との質疑応答の意見などを総合して研究総括が最終的な評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成 25 年 5、12 月 評価会開催

平成 26 年 3 月 研究総括による事後評価

平成 26 年 3 月 被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

- (1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況
- (2) 得られた研究成果の当該分野への波及効果
- (3) 今後への研究展開・期待ほか

9. 評価結果

平成 22 年度採択研究者のうち、研究期間3年として採択された9名の研究者についての事後評価を以下に報告する。各研究者とも精力的に研究展開を行い、その成果論文の多くはインパクトファクターの高い学術国際誌や専門学協会の学術集会で発表されている。いずれの研究も今後一層の研究展開に大いに期待が持たれる。

1. 伊福 健太郎研究者「安定デバイス創製にむけた光合成光反応制御機構の解明」

伊福健太郎博士は、「緑色植物が営む光合成を理解し、学ぶ」視点から、特に光合成で最も重要な機能の一つである「水から電子を汲み上げる」機能を発現する光合成反応中心 PSII について、緑色植物が進化の過程で独自に発達させた PSII の安定化と制御機構を明らかにすることを目指した意欲的な研究提案を行い採択された。

具体的には緑色植物型 PSII の膜表在性タンパク PsbP に関する伊福博士のそれまでの卓越した研究実績をもとに PSII の機能修復に着目し、生物学、生物化学、遺伝子科学、化学、機器分析化学など多面的な研究手法により膜表在性タンパクの構造、結合部位、機能の解明に切り込んでいる。研究開始より順調に成果を上げている。

ホウレンソウから単離した PSII 膜を用い、PsbP 及び PsbQ タンパク質と相互作用する PSII 膜タンパク質サブユニットの同定に成功し、高等植物の PSII 膜表在性サブユニットの結合様式のモデルを構築した。また、PsbP や CyanoP とアミノ酸配列相同性を示す PsbP-like protein 1 (PPL1) の機能に注目し、シアノバクテリアの PsbP ホモログ (CyanoP) のアミノ酸配列が緑色植物において進化し二つの PsbP ホモログが違う役割で機能 (PSII の活性制御のみならず、集光タンパク質 (LHC) との相互作用) することを初めて明らかにした。

人工光合成の実現に挑戦する研究姿勢の中で「自然を理解し、学ぶ」視点は、人類智を獲得し蓄積する学術活動の最も基本的で普遍的なアプローチといえる。好熱性シアノバクテリアの PSII 複合体の立体構造の解明が進みつつある現状で、伊福博士の研究成果は、今後さらに進んで、高等植物の PSII の構造解明、機能解明に踏み込む状況を切り開く突破点の一つになり得るものと期待している。

2. 熊崎 茂一研究者「油生産緑藻の葉緑体と細胞全体生理の相関を見る多角的顕微分光分析」

近年、藻類を用いてバイオ燃料を生産しようとする試みが注目される一方で、エネルギー収支の視点からは正味のエネルギー生産は達成できていない現状で、多くの研究努力が望まれている。

熊崎茂一博士は、自身の超高速計測技術、顕微分光技術、に関する先端的研究実績を基礎に非破壊型リアル

タイム分析、空間・時間分解分光分析手法を生体材料観察、解析に適用し得る手法を開発するという意欲的研究提案を行い採択された。研究開始後、若干の誘導期間はあったが、光合成生物の研究に適した顕微蛍光減衰測定、顕微蛍光スペクトル測定、顕微ラマン散乱スペクトル測定系の開発に成功した。

具体的な測定実例としては、クロレラを顕微蛍光スペクトル画像と蛍光寿命画像で調べ、葉緑体活動の変化と中性脂肪の蓄積を同時かつ精密に観測することに成功している。また、窒素固定能力を持つ異形細胞(ヘテロシスト)が数十時間の間に通常の栄養細胞から形成される過程をリアルタイムで、同一細胞について約 100 時間にわたりタイムラプス顕微分光観測を実現した。2nm の波長分解能を有するライン走査蛍光スペクトル顕微鏡と網羅的スペクトル解析、およびユニークな近赤外励起により狭い波長領域に混在する多種類の色素タンパク質の増減を分離観測することに成功している。

また光合成生物組織中の非蛍光性分子をラマン散乱スペクトルにより可視化する技術基盤の構築にも貢献した。生体材料に適用可能な非破壊リアルタイム顕微分光システムの構築と実試料の観測例について、今後は、いっそうの論文発表の形で示すことにより、大きい波及効果を期待したい。

3. 定金 正洋研究者「分子性酸化物を用いた高効率な水の完全酸化触媒の創生」

人工光合成の実現への最も大きい解決すべきボトルネック課題は、水分子の酸化活性化である。いかにして有効に水分子から電子を汲み出すかである。特に、その過程でいかにして耐久性のある触媒系が実現できるかが喫緊の課題となっている。

定金正洋博士は、自身のポリオキソメタレート触媒開発の実績を基礎に、耐久性のある高効率な水の酸化触媒開発について意欲的な研究提案を行い採択された。研究開始後、若干の誘導期間が見られたが、研究期間内に見事に、世界最高の触媒効率を有する新規触媒の開発に成功した。

具体的には 2 つのポリオキソメタレート(ドーソン型リンタングステートから 3 つのタングステンを外したものとケギン型ゲルマノタングステートから 3 つのタングステンを外したもの)の化学処理により非常に触媒活性の高い固体が得られることを見出した。この新規ポリオキソメタレート材料を触媒として用い、化学酸化および光励起による酸化方法の両方で水の酸化これまでに報告のある触媒に比して優れた触媒活性を示すことを見出している。

水の酸化触媒は人工光合成のキーポイントであるので、今後の一層の研究展開に期待している。

4. 坪井 泰之研究者「光アンテナにナノ粒子や分子を集める・観る・反応させる」

人工光合成の実現に向けて解決すべきボトルネック課題のうち、光捕集方法の開発は殆ど未開拓と言って良い状況にある。太陽光の非常に小さい光子束密度条件をいかにして克服するかは最も重要な解決課題である。

坪井泰之博士は自身の先端的光化学研究の実績を基礎に分子系を捕捉し、観測し、さらに光を集めて反応させ得る反応場として、貴金属ナノギャップに着目し意欲的な研究提案を行い採択された。

貴金属ナノギャップに誘起される局在表面プラズモン共鳴により誘起される超強電場増幅効果は光の捕集に加えて、光を吸収する分子系を捕集する相乗効果が期待できることから、極めて興味深い研究目標と評価できる。さきがけ研究開始と同時に、次々と、微粒子、高分子系化合物をはじめ、「捕捉し」、「観察する」ことに成功している。現象論的な報告にとどまることなく現象の学理の解明にも挑戦している。さらに進んでは、さきがけ研究者との共同研究により光合成光捕集系のナノギャップへの取り込みにも挑戦しておりその積極的な研究姿勢は高く評価できる。今後も、プラズモン共鳴の化学を先導するいっそうの研究努力に期待したい。

5. 永島 賢治研究者「光合成で駆動する新しい生物代謝」

永島賢治博士は、紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* の全ゲノム解析をはじめとする自身による先端研究の実績を基礎に、進化の過程を部分的に取り込んだ遺伝子操作により、光合成電子伝達経路の改変に挑戦し光エネルギーを物質生産や環境浄化に利用するためのブレークスルーを見いだそうという意欲的な研究提案を行い採択された。

さきがけ研究開始後も紅色光合成細菌の全ゲノム解析を継続し遺伝子情報解読を完了させている。全ゲノム解析の結果、ニトロゲナーゼの遺伝子群や拮抗反応を触媒する uptake ヒドロゲナーゼの遺伝子に注目し遺伝子操作技術を駆使することにより変異株を作成して高効率の水素発生に成功している。

粘り強い研究努力の結果、特筆すべきは、光合成遺伝子の種間水平移動という進化過程を実験により再現することに成功したことであろう。紅色光合成細菌の種間で実際に反応中心遺伝子の入れ替えを試み、70%程度以上のアミノ酸配列相同性があれば、異種反応中心複合体による光合成生育が可能であることを示した。これは光合成遺伝子の種間水平移動という進化過程を人工的に再現できたことを意味しており、極めてインパクトの大きい研究成果と考えられる。非光合成生物に光合成機能を導入する明確な足掛かりが得られたと評価できる。実際に、葉緑体やシアノバクテリアの光化学系2のペプチド部位を、紅色光合成細菌の反応中心複合体の対応部位と交

換・導入した変異株シリーズを作成するなど意欲的な研究展開を行っている。これまでの研究成果を基礎に今後
いっそうの展開が大いに期待できる。

6. 野口 秀典研究者「光エネルギー変換過程における固/液界面構造のその場計測」

人工光合成を誘起する光化学初期過程の多くは、固体と溶液の界面で進行するが、その反応過程の学理を理解するには、界面の電子状態、吸着分子の構造、配向を原子・分子サイズの空間分解能で、またその反応進行をリアルタイムの超高速時間分解能で観察する必要がある。さらには反応が実際に進行している系、溶媒が大量に共存する「その場」、での観測が望まれる。

野口秀典博士は上記の視点から、自身の超高速非線形分光領域の研究実績を基礎に、主に界面選択的な時間分解振動分光法(フェムト秒赤外過渡吸収分光法、和周波発生分光法)により、固/液界面における光エネルギー変換プロセスの学理を解明する意欲的な研究提案を行い採択された。研究開始から若干の誘導期間が必要ではあったが、現実感のある反応系で超高速のキャリアダイナミクスについて振動分光法を取り入れた信頼度が極めて高い観測に成功している。特に光触媒半導体上に担持された金属クラスターへのキャリア電子到達速度やその滞在時間の実観測は、極めてインパクトの大きい事例として注目される。また、電気化学反応過程についても界面敏感な二次の非線形光学分光法をベースとした新規高感度固/液界面計測システムを構築し、観測に成功している。

研究総括としては、野口博士の卓越した超高速計測技術を武器に、その場測定、実時間測定での人工光合成系に関する共同研究を大いに期待したが、さきがけ研究期間内では充分には実現できなかったのが残念である。今後、いっそうの共同研究の推進を期待したい。

7. 堀田 純一研究者「超解像蛍光顕微鏡による珪藻のバイオミネラル化の解析」

地球上の光合成は主に海洋中で行われている。珪藻は海洋における炭酸ガスの固定など一次生産者として重要な役割を果たしている。珪藻はその被殻をバイオミネラル化によるナノ構造シリカで形成している。機能性ナノ構造材料としても興味深い。珪藻が営む光合成とバイオミネラル化は光エネルギーと資源循環の視点からも大変興味深い研究対象と言える。

堀田純一博士は、超解像蛍光顕微鏡などに関する自身の着実な研究実績を基礎に、超解像観察の生体試料として珪藻に着目し、自家蛍光の強い生体試料をいかにして超解像観察するについて意欲的な研究提案を行い採択された。珪藻を機能性ナノ構造材料としても着目し新しい記録材料開発への挑戦も提案した。

さきがけ研究開始直後にベルギーから日本に異動し、さらに異動後も新しい研究施設への移転など、困難な状況を克服しながら誘導期間を経て、実際に超解像顕微鏡測定装置を立ち上げ、新たに日本沿岸から採集した数種の珪藻について蛍光色素の自発的な取り込みを利用して珪藻被殻形成過程のタイムラプスイメージングを行うことに成功している。構造化照明顕微鏡法を用いることにより、生きた珪藻における超解像蛍光顕微鏡測定を行うことにも成功した。光合成生物用の新しい蛍光タンパク質の開発にも挑戦している。これまでの論文発表状況は必ずしも充分とは言えないが、今後のいっそう集中した研究展開を期待している。

8. 前田 和彦研究者「表面バンドエンジニアリングによる高性能水分解光触媒の創生」

人工光合成の実現の本命とされている可視光を用いた半導体光触媒による水の完全分解、水素と酸素の生成は我が国の研究グループが世界を先導している。前田和彦博士は、その研究グループの一つに属し、研究展開の推進力となっている新進気鋭の研究者である。

さきがけ研究では半導体光触媒の反応効率を左右する最も重要な要因として、表面近傍の欠陥に着目した意欲的な研究提案を行い採択された。さきがけ研究以前の極めて精力的な研究展開の実績と期待に違わず、さきがけ研究開始と同時に、可視光感受性半導体光触媒系の開発と学理の解明に関して次々と極めてインパクトの高い研究成果を積み重ねている。前田博士の力強い研究推進は他のさきがけ研究者にも多大な感銘と影響を与えている。研究総括としては、めざましい研究成果を生み出す前田博士の独創性と粘り強い研究努力に敬意を表する。今後、人工光合成システム完成に向けて、いっそうの研究展開が大いに期待できるが、適切な時期に適切な研究支援が強く望まれる。

9. 村橋 哲郎研究者「光化学的手法による天然有機色素の金属バインディング機能創出」

物質科学のフロンティア領域の中でも、超分子系包接環境の科学、多電子変換系の科学、分子の構造変化が誘起する巨視的機能の科学、新しい原子集団形成と機能発現などは新領域として急速な進展が期待されている。

村橋哲郎博士は、新しい原子集団形成と機能発現のパイオニア研究者として有機化合物と金属原子の結合形成についての自身の卓越した研究実績を基礎に、 π -共役系有機色素類の金属バインディングに関する、意欲的な

研究提案を行い採択された。

研究開始直後より、めざましい研究進展速度で π -共役系構造を持つ有機色素類の特異な金属バインド能の解明・実証を進めている。具体的には、代表的な天然カロテノイド色素である β -カロテンが 10 核金属種をサンドイッチ型にバインドすることを初めて明らかにした。さらに、人工系有機色素をバインダーとして持つモデル金属クラスターを用いて、レドックス機能解明に関する研究を進め、拡張 π -共役系不飽和炭化水素と金属集合体のハイブリッド体が金属集合性の変化を伴う新しいタイプのレドックス応答性を示すことを見出した。即ち、拡張 π -共役系不飽和炭化水素に挟み込まれた金属集合体が、レドックスに応答して可逆的に分裂・集合する現象を示すことを発見している。

このような矚目すべき研究展開はさきがけ研究者に望まれるフルスイングによる研究挑戦の模範例とも言える。一方で、人工光合成の実現には、多電子変換過程をいかにして制御し効率的なシステムを構築できるかが解決すべきボトルネック課題の一つである。村橋博士には、今後、この多電子変換過程の科学について正面からの挑戦を期待したい。

10. 評価者

研究総括

井上 晴夫 首都大学東京 人工光合成研究センター長・教授

International Advisor

徳丸 克己 筑波大学名誉教授

朴 鐘震 高麗大学材料化学部門教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 26 年 3 月末現在)

石谷 治 東京工業大学大学院理工学研究科・教授

伊藤 攻 東北大学名誉教授

伊藤 繁 名古屋大学名誉教授

喜多村 昇 北海道大学大学院理学研究院・教授

工藤 昭彦 東京理科大学理学部応用化学科・教授

瀬戸山 亨 (株)三菱化学技術(株)研究センター合成技術研究所・所長

嶋田 敬三 首都大学東京大学院理工学研究科・客員教授

沈 建 仁 岡山大学大学院自然科学研究科・教授

高木 克彦 (財)神奈川科学技術アカデミー・研究顧問兼有機系太陽電池評価

プロジェクトリーダー

民秋 均 立命館大学大学院生命科学研究科・教授

堂免 一成 東京大学大学院工学系研究科・教授

橋本 和仁 東京大学大学院工学系研究科・教授^{*1}

藤田 恵津子 Brookhaven National Laboratory 化学部門・Senior Chemist

真嶋 哲朗 大阪大学産業科学研究所・教授

松永 是 東京農工大学学長^{*1}

宮坂 博 大阪大学大学院基礎工学研究科・教授

*1 平成 21 年 10 月～平成 22 年 8 月まで参画

(参考)

件数はいずれも、平成 26 年 3 月末現在。

(1) 外部発表件数

| | 国内 | 国際 | 計 |
|-----|-----|-----|-----|
| 論文 | 9 | 70 | 79 |
| 口頭 | 173 | 94 | 267 |
| その他 | 29 | 12 | 41 |
| 合計 | 211 | 176 | 387 |

(2)特許出願件数

| 国内 | 国際 | 計 |
|----|----|---|
| 0 | 0 | 0 |

(3)受賞等

- ・伊福健太郎
日本農芸化学会 奨励賞(H23年5月)
- ・定金正洋
広島大学 Distinguished Researcher(H25年2月)
- ・堀田純一
山形大学 研究推進報奨(H25年3月)
- ・前田和彦
英国王立化学会, 第6回 PCCP Prize (H24年2月)
触媒学会 第109回触媒討論会優秀ポスター発表賞 (H24年4月)
日本化学会 第92春季年会優秀講演賞(学術)(H24年4月)
触媒学会 第110回触媒討論会若手優秀講演賞(H24年9月)
日本化学会 進歩賞(H26年2月)

(4)招待講演

- ・伊福健太郎
国際 4件
国内 4件
- ・定金正洋
国際 3件
国内 3件
- ・坪井泰之
国際 10件
国内 20件
- ・堀田純一
国際 1件
国内 3件
- ・前田和彦
国際 5件
国内 3件
- ・村橋哲郎
国際 9件
国内 11件

(3年型)

| 研究者氏名 (参加形態) | 研究課題名 (研究実施場所) | 現職(平成26年3月末現在) (応募時所属) | 研究費 (百万円) |
|-----------------|---|---|--------------|
| 伊福健太郎 (兼任) | 安定デバイス創製にむけた光合成 光反応制御機構の解明 (京都大学) | 京都大学大学院生命科学研究科助教 (同上) | 39.4 |
| 熊崎茂一 (兼任) | 油生産緑藻の葉緑体と細胞全体生理 の相関を見る多角的顕微分光分析 (京都大学) | 京都大学大学院理学研究科准教授 (同上) | 36 |
| 定金正洋 (兼任) | 分子性酸化物を用いた高効率な 水の完全酸化触媒の創生 (広島大学) | 広島大学大学院工学研究院准教授 (同上) | 37.6 |
| 坪井泰之 (兼任) | 光アンテナにナノ粒子や分子を 集める・観る・反応させる (北海道大学・大阪市立大学) | 大阪市立大学大学院理学研究科教授 (北海道大学大学院理学研究院 准教授) | 43.1 |
| 永島賢治 (専任) | 光合成で駆動する新しい生物代謝 (首都大学東京・神奈川大学) | 神奈川大学光合成水素生産研究所 客員教授 (首都大学東京大学院理工学研究科 准教授) | 43.8 |
| 野口秀典 (兼任) | 光エネルギー変換過程における固/液 界面構造のその場計測 (物質・材料研究機構) | 物質・材料研究機構国際ナノアーキ テクトニクス研究拠点研究員 (同上) | 39 |
| 堀田純一 (兼任) | 超解像蛍光顕微鏡による珪藻の バイオミネラリゼーションの解析 (山形大学) | 山形大学大学院理工学研究科准教授 (ベルギー・ルーバンカトリック大学博 士研究員) | 60.7 |
| 前田和彦 (兼任) | 表面バンドエンジニアリングによる 高性能水分解光触媒の創生 (東京大学・東京工業大学) | 東京工業大学大学院理工学研究科 准教授 (東京大学大学院工学系研究科助教) | 47.8 |
| 村橋哲郎 (兼任) | 光化学的手法による天然有機色素の 金属バインディング機能創出 (大阪大学・分子科学研究所) | 自然科学研究機構分子科学研究所 生命・錯体分子科学研究領域教授 (大阪大学大学院工学研究科准教授) | 44.4 |

研究報告書

「安定デバイス創製にむけた光合成光反応制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 伊福 健太郎

1. 研究のねらい

近年、石油資源の不足と地球環境悪化の両面から、バイオエネルギーやバイオ資源への期待が大きく、光合成研究への社会的注目度が高まっている。なかでも光合成生物による酸素発生反応は、光エネルギーを利用して水を酸化し電子を供給するという光エネルギー・物質転換の根幹をなす反応として非常に重要な研究対象である。

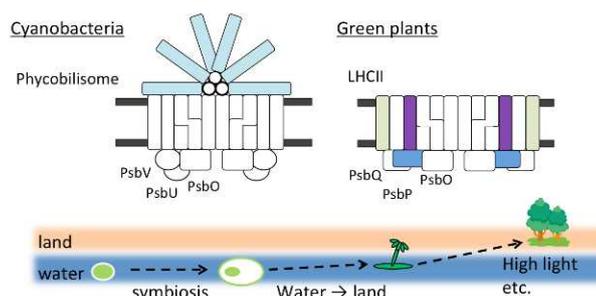


図 1. シアノバクテリアと緑色植物 PSII の周辺構造の違い

植物の光合成の水分解反応は、光化学系 II 色素タンパク質複合体 (Photosystem II、以下、PSII と略す) によって行われる。2011 年に好熱性シアノバクテリア PSII の立体構造が原子分解能で解明され、未解明な水分解-酸素発生機構が解明される期待が高まっている。一方、高等植物を始めとする緑色植物型の PSII は、シアノバクテリア型と異なる集光タンパク質や色素を有し、かつ、触媒部位である MnCaO_5 クラスターを取り囲む膜表面タンパク質の組成が異なる。即ち、シアノバクテリアはフィコビリソームを集光タンパク質として持ち、膜表面タンパク質は PsbO, PsbU, PsbV であるのに対し、緑色植物は Light-harvesting complex (LHC) を集光タンパク質として用い、膜表面タンパク質は PsbO, PsbP, PsbQ となっている(図 1)。こうした変化は、生育環境の変化に合わせた光合成光反応制御機構として重要な役割を持つと考えられるが、その詳細は明らかではなかった。

そこで本研究では、緑色植物型 PSII 独自の PSII サブユニットの分子機能を詳細に解析し、緑色植物が進化の過程で独自に発達させた PSII の安定化と制御機構を明らかにすることを目指した。特にこれまでの研究の経緯から、緑色植物型 PSII の膜表面タンパク質である PsbP に着目した。PsbP は PSII において MnCaO_5 クラスターの構築と正常な機能に必須な役割を持ち、植物の光独立栄養的な生育に必須であることが明らかとなっている。にもかかわらず、緑色植物型 PSII における PsbP の結合位置や機能発現の詳細は未解明であった。そこで本研究では、PsbP の分子機能解明を手がかりに、緑色植物型 PSII の構造と機能を解析することを計画した。その上で、水分解-酸素発生反応を行う天然のデバイスである PSII 複合体の活性と安定性を人為的に操作する方策を検討した。

2. 研究成果

(1) 概要

PsbP の分子表面に存在するアミノ酸残基に、様々な部位特異的アミノ酸変異を導入した組換え PsbP タンパク質を作成し、in vitro PSII 活性再構成実験によって酸素発生活性の活性化能を解析した。その結果、すでに報告がある PsbP の N 末端配列に加え、PSII との機能的な相互作用に関与しているアミノ酸残基を複数同定し、PsbP の PSII に対する結合トポロジーを明確にした。また、PsbP と共に PSII に結合する PsbQ が、PsbP の結合を安定化する役割を持つことを報告した。さらにホウレンソウから単離した PSII 膜を材料に、組換え PsbP を用いた再構成実験に化学架橋とアフィニティークロマトグラフィーを組み合わせることで、PsbP 及び PsbQ タンパク質と相互作用する PSII 膜タンパク質サブユニットの同定に成功した。これらの情報を、電子顕微鏡を用いた最新の高等植物 PSII 超複合体の単粒子解析像に統合することにより、高等植物の PSII 膜表在性サブユニットの結合様式のモデルを構築した。

一方、シアノバクテリアには PsbP の祖先(ホモログ)と考えられる CyanoP タンパク質が存在し、緑色植物には、PsbP や CyanoP とアミノ酸配列相同性を示す PsbP-like protein 1 (PPL1) が存在する。CyanoP を欠損する *Synechocystis* sp. PCC 6803 細胞では PSII の活性に大きな影響が認められなかったが、PPL1 を欠損するシロイヌナズナ (*ppl1i* 株)では、光阻害からの回復能が低下するとともに、集光タンパク質と PSII 複合体との相互作用に変化が生じ、光環境が変動する環境に適応できなくなることが明らかとなった。

以上の結果から、シアノバクテリアの PsbP ホモログ (CyanoP) のアミノ酸配列が緑色植物において進化し、二つの PsbP ホモログ (PsbP と PPL1) として、PSII の活性制御のみならず、集光タンパク質 (LHC) との相互作用にも関わっていることを明らかにした。これらの知見をもとに、PsbP タンパク質のアミノ酸配列を改変し、水分解-酸素発生反応を行う天然のデバイスである PSII 複合体の活性と安定性を人為的に操作することを試みた。

(2) 詳細

研究テーマ A: 「PsbP による光化学系 II 活性制御機構の解析」

PsbP は、水分解-酸素発生反応に必須なカルシウムイオンと塩素イオンの Mn クラスター近傍への結合に重要なことが知られている。PsbP の分子表面に存在するアミノ酸残基に、様々な部位特異的アミノ酸変異を導入した組換え PsbP タンパク質を多数作成し、ホウレンソウから単離した組換え PSII 膜を用いた in vitro PSII 活性再構成実験によって酸素発生活性の活性化能を解析した。加えて、変異 PsbP の結合に伴う酸素発生系の構造変化を FTIR で解析した。その結果、すでに報告されている PsbP の N 末端配列に加え、保存された His144 周辺構造(図2)、並びに、Arg48、Lys143、Lys160 から構成される保存された塩基性領域(図3)が PSII との機能的な相互作用、特に塩素イオンの結合に関与していることを明らかにした(Doi et al. 2012; Nishimura et al. 2014)。これによって PsbP の PSII に対する結合トポロジーが明確となった。加えて、PsbP と共に PSII に結合する PsbQ が、PsbP の結合を安定化する役割を持つことを明らかにした(Kakiuchi et al. 2012)。

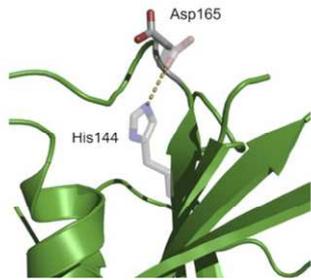


図2. PsbPの立体構造中で、His144はAsp165と塩橋を形成する（透明モデル）。His144の変異は、その相互作用を妨げ、PsbPとPSIIの正常な相互作用を妨げると考えられた。（Ido et al. 2012より）

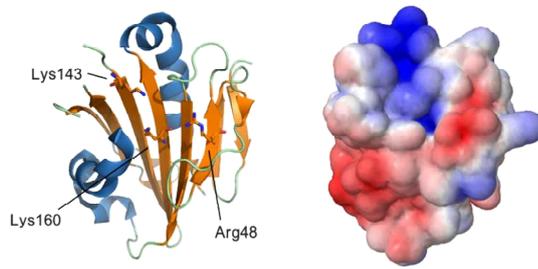


図3. PsbPの立体構造モデルと表面電荷
PsbPの分子表面には保存された塩基性領域（青色）が存在し、PSIIとの相互作用に重要である。（Nishimura et al. 2014より）

研究テーマB:「高等植物のPSII膜表在性サブユニットの相互作用様式」

PsbPとPsbQのC末端にシステインを導入し、ビオチンでラベル化後、PSIIに再構成した。その後、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)とN-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS)を用いて化学架橋した後、架橋産物をストレプトタビジンカラムで精製した。精製産物をSDS-PAGEで分離し、トリプシン消化後、LC-MS/MS解析した結果、PsbP及びPsbQタンパク質と相互作用するPSII膜タンパク質サブユニットを複数同定することができた。その結果、PsbPとPsbQは、各々がPSIIコアサブユニットに加え、集光タンパク質とも相互作用することが明らかとなった。さらにいくつかの架橋産物に関しては、架橋されるアミノ酸残基を決定した（図4：一部をIdo et al. 2012で発表）。これらの情報を、電子顕微鏡を用いた最新の高等植物PSII超複合体の単粒子解析像に統合することにより、高等植物のPSII膜表在性サブユニットの結合様式のモデルを構築した。

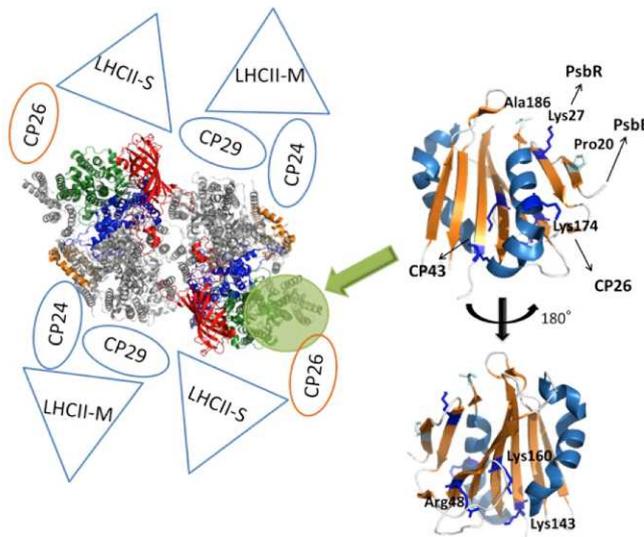


図4. 緑色植物型PSII-LHCII超複合体におけるPsbPの結合位置とトポロジー。

PSII反応中心は*Thermosynechococcus vulcanus*のPSII結晶構造(PDB ID:3ARC)を用い、集光アンテナの結合位置は[Caffarri et al. EMBO J., 28, 3052-63, 2009]をもとに作図した。D1を青色、CP43を濃緑色、PsbEを橙色、Psb0を赤色のリボンモデルで示した。PsbPが結合すると思われる位置を緑色の円で示した。

研究テーマ C: 「PsbP ホモログによる PSII の活性制御機構の解析」

シアノバクテリアには PsbP の祖先(ホモログ)と考えられる CyanoP タンパク質が存在し、緑色植物には、PsbP や CyanoP とアミノ酸配列相同性を示す PsbP-like protein 1 (PPL1) が存在する (Ifuku, 2014)。各々の遺伝子欠損変異体を用いた解析の結果、CyanoP を欠損する *Synechocystis* sp. PCC 6803 細胞では PSII の活性に大きな影響が認められなかったのに対し (Aoi et al. 2014)、PPL1 を欠損するシロイヌナズナ (*ppl1i* 株) では、光阻害からの回復能が低下するとともに、集光タンパク質を結合した PSII-LHCII 超複合体の蓄積量が減少していた。さらに *ppl1i* 株では、非光化学消光 (NPQ) の生成が非効率となり、かつ、PSII と PSI との励起バランスを調節するステート遷移において、PSII コアから LHCII の解離が早くなることを認めた。実際に *ppl1i* 株を光環境が変動する環境で栽培した結果、野生型に比べて明らかに成長が阻害された。従って、PPL1 は植物の光環境適応に重要な役割をもち、PSII-LHCII 超複合体を安定化する機能を持つことを明らかにした。

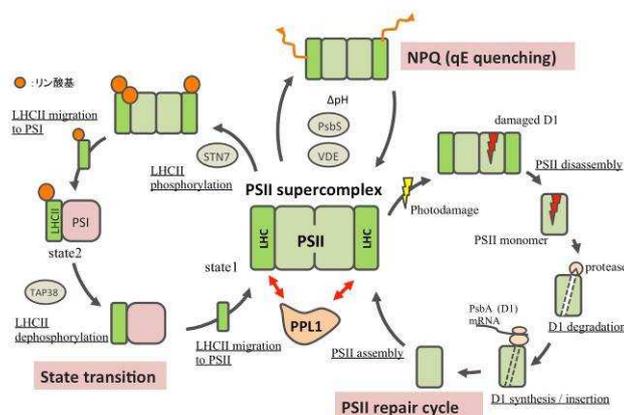


図 5 : PsbP 構造 (PsbP-Like protein) を用いた新たな PSII 活性の制御

3. 今後の展開

近年、原核光合成生物である好熱性シアノバクテリアの PSII 複合体の立体構造の解明が急速に進んだこともあり、PSII に関する分子レベルでの研究はシアノバクテリアを中心に進んでいる。しかしながら、PsbP を有する高等植物などの緑色植物は、作物やエネルギー資源としても重要であり、今後は緑色植物型 PSII 研究への要請が高まると考えている。本研究で得られた成果はそのさきがけとなるものであり、PSII の水分解活性、もしくはその安定性を向上させる変異を導入した PsbP を植物や藻類に発現させることで、光合成の生産性や植物の環境ストレス耐性を改善することが期待される。さらにそうした植物や藻類は、緑色植物型の PSII の複合体構造を原子レベルで解明し、その反応を試験管内で解析するための良い材料を供給することが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

原子レベルでの構造が解明されていない緑色植物の光化学系IIの研究を、本さがけ領域の化学・物理学の研究者にいかにも面白いと思ってもらうかに、随分、悩んだ時期もあった。それに捕われて、やや無理をして研究方針がぶれてしまい、成果を論文としてまとめるのが遅れてしまったのが大きな反省である。

本研究のねらいのひとつである、緑色植物型 PSII の酸素発生系(膜表面タンパク質)の機能と配置に関しては、未だ原子レベルの議論ができる段階ではないが、PsbP の相互作用に関して予想しなかった新しい知見が得られ、大きく進展があったと考えている。しかしながら化学架橋の実験においては、質量分析による架橋部位の同定ができなかった部位も多く、スピラベルを用いたパルス ESR の距離情報も完全ではなかったことから、精密化という点では課題が残った。その一方で、PsbP ホモログである PPL1 の分子機能解析については、変異植物体で明確な表現型を認め、緑色植物の PSII には二つの PsbP ホモログが違う役割で機能するということを明確に証明できた。本研究の題目である、デバイスとしての PSII 複合体の活性と安定性を人為的に操作する方策についても、まだ未発表であるが期待できる成果を得つつある。全体としては、論文化に遅れがみられるものの、全ての成果を論文としてまとめれば、当初のねらいの多くは達成できるものと考えている。

最後に、本領域に加えていただくことで、生物学的な観点からとはまったく異なる視点と、研究に対する価値観を学ばせて頂いた。お世話になった領域代表の井上先生をはじめ、激励いただいた領域アドバイザー、領域関係者すべての皆様に感謝申し上げます。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

伊福健太郎博士は、「緑色植物が営む光合成を理解し、学ぶ」視点から、特に光合成で最も重要な機能の一つである「水から電子を汲み上げる」機能を発現する光合成反応中心 PSII について、緑色植物が進化の過程で独自に発達させた PSII の安定化と制御機構を明らかにすることを旨とした意欲的な研究提案を行い採択された。

具体的には緑色植物型 PSII の膜表面タンパク PsbP に関する伊福博士のそれまでの卓越した研究実績をもとに PSII の機能修復に着目し、生物学、生物化学、遺伝子科学、化学、機器分析化学など多面的な研究手法により膜表面タンパクの構造、結合部位、機能の解明に切り込んでいる。研究開始より順調に成果を上げている。

ホウレンソウから単離した PSII 膜を用い、PsbP 及び PsbQ タンパク質と相互作用する PSII 膜タンパク質サブユニットの同定に成功し、高等植物の PSII 膜表面タンパク質の結合様式のモデルを構築した。また、PsbP や CyanoP とアミノ酸配列相同性を示す PsbP-like protein 1 (PPL1) の機能に注目し、シアノバクテリアの PsbP ホモログ (CyanoP) のアミノ酸配列が緑色植物において進化し二つの PsbP ホモログが違う役割で機能(PSII の活性制御のみならず、集光タンパク質 (LHC)との相互作用)することを初めて明らかにした。

人工光合成の実現に挑戦する研究姿勢の中で「自然を理解し、学ぶ」視点は、人類智を獲得し蓄積する学術活動の最も基本的で普遍的なアプローチといえる。

好熱性シアノバクテリアの PSII 複合体の立体構造の解明が進みつつある現状で、伊福博士の研究成果は、今後さらに進んで、高等植物の PSII の構造解明、機能解明に踏み込む状況を切り開く突破点の一つになり得るものと期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表 *は責任著者

- | |
|--|
| 1. Ido K, Kakiuchi S, Uno C, Nishimura T, Fukao Y, Noguchi T, Sato F, *Ifuku K (2012) "The conserved His-144 in the PsbP protein is important for the interaction between the PsbP N-terminus and the Cyt <i>b</i> ₅₅₉ subunit of photosystem II" <i>J. Biol. Chem.</i> 287 : 26377-26387. |
| 2. Nishimura T, Uno C, Ido K, Nagao R, Fukao Y, Noguchi T, Sato F, *Ifuku K (2014) "Identification of the basic amino acid residues on the PsbP protein involved in the electrostatic interaction with photosystem II" <i>Biochim Biophys Acta (Bioenergetics)</i> , in press. |
| 3. Kakiuchi S, Uno C, Ido K, Nishimura T, Noguchi T, *Ifuku K, Sato F (2012) "The PsbQ protein stabilizes the functional binding of the PsbP protein to photosystem II in higher plants" <i>Biochim Biophys Acta (Bioenergetics)</i> , 1817 : 1346-1351. |
| 4. *Ifuku K (2014) "The PsbP and PsbQ family proteins in the photosynthetic machinery of chloroplasts" <i>Plant Physiol. Biochem.</i> in press. |
| 5. Aoi M, Kashino Y, *Ifuku K (2014) "Function and association of CyanoP in photosystem II of <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803" <i>Res. Chem. Intermed.</i> , in press. |

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【国際学会等:招待講演】

1. Kentaro Ifuku, "INTERACTION AND FUNCTION OF THE MEMBRANE-EXTRINSIC PROTEINS OF PHOTOSYSTEM II IN HIGHER PLANTS" International Conference, Photosynthesis Research for Sustainability, Baku, Azerbaijan, 2013/06/06
2. Kentaro Ifuku, "Molecular Functions of the Membrane-Extrinsic Subunits of Photosystem II in Higher Plants" The 5th International Conference as the 2012 OCARINA Annual International Meeting, Osaka, 2013/03/05
3. Kentaro Ifuku, "Evolution of the OEC family proteins in chloroplasts and plant adaptation to the environment", Japan-Finnish Seminar 2012, Naantali, Finland, 2012/09/8-13
4. Kentaro Ifuku, "Functional Diversification of photosystem II extrinsic subunits in higher plants", International Conference, Photosynthesis Research for Sustainability, Baku,

Azerbaijan, 2011/07/27

【国内学会:シンポジウム講演】

1. 伊福健太郎,「チラコイド膜タンパク質複合体の機能を支える膜表在性タンパク質の役割」, 日本植物学会第 77 回大会シンポジウム, 札幌, 2013/9/15
2. 伊福健太郎「緑色植物型の膜表在性タンパク質による光化学系 II 水分解反応の制御機構」日本植物生理学会シンポジウム, 岡山, 2013/03/21
3. Kentaro Ifuku, “Functions of Thylakoid Lumenal Proteins Against Photoinhibition of Photosystem II”, 第 54 回 日本植物生理学会年会シンポジウム, 岡山, 2013/03/23
4. 伊福健太郎「高等植物における光化学系 II 膜表在性タンパク質の配置と機能」第 85 回日本生化学会大会シンポジウム、福岡、2012/12/15

【受賞】

平成 23 年 日本農芸化学会奨励賞

「光合成電子伝達鎖を制御する葉緑体酸素発生系タンパク質の分子機能に関する研究」

【日本語総説】

1. 伊福健太郎,「光化学系 II の光障害に対するチラコイド膜内腔タンパク質の役割」, 光合成研究 23 (2), 86-93 (2013)
2. 伊福健太郎,「葉緑体酸素発生系タンパク質の分子進化と植物の環境適応」, 生化学 84 (11), 934-938 (2012)

【アウトリーチ活動】

サイエンスカフェ

「光合成～地球を支える植物のちから～」in 京都大学アカデミックデイ 2013

京都大学百周年時計台記念館 2013 年 12 月 21 日

研究報告書

「油生産緑藻の葉緑体と細胞全体生理の相関を見る多角的顕微分光分析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 熊崎 茂一

1. 研究のねらい

微細藻類を用いて中性脂質等のバイオ燃料原料物質を生産する試みが注目されている。しかし、未だエネルギー収支上では正味のエネルギー生産には至っていない。光合成生物をエネルギー生産や有用物質生産に活かすために様々な培養方法が検討される必要があり、また野生に存在する未知の有用藻類を探索する努力も必要である。さらに、微細藻類に限定せず、植物やシアノバクテリア等に着目することも重要である。いずれにせよ、細胞毎、細胞内部位毎、多細胞生物の組織毎に、生理的条件下で光合成活動や各種代謝産物の増減を詳しく調べられることによって光合成生物の理解を深め、利用方法を探索する必要がある。生体破碎、分離技術を用いることなく細胞生理の研究をするためには光学顕微鏡、できれば情報豊富が顕微分光が理想的な道具である。ただし、顕微分光には原理的にも技術的にも改良の余地が多い。得られる情報の意味や最適な測定条件を精査し、目的に合った解析ソフトウェアも必要である。本課題では光合成生物の研究に適合した顕微蛍光減衰測定、顕微蛍光スペクトル測定、顕微ラマン散乱スペクトル測定系を開発、改良することを基本とする。可能な限り既存の分析手法の能力を超える顕微分光法の開発を目指した。それらの技術をなるべく多角的に用いて、シアノバクテリア、緑藻、植物等が示す、光環境応答、栄養欠乏に対する様々な応答、および細胞分化に伴う細胞生理の変化についての得られる情報の質と量を大幅に改善する。その結果として光合成生物学に関する新しい知見の獲得も目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

窒素はタンパク質や核酸の構成原子であり生体に欠かせないものである。しかし大多数の光合成生物は大気中に大量に存在する N_2 を直接利用できず、環境に既に固定されたアンモニウム塩、硝酸塩、亜硝酸塩などを直接または間接的に利用する。環境中の窒素栄養が不足すると中性脂肪を細胞内に蓄積する藻類が多く知られており、本研究で特性を調べた緑藻の一種 *Parachlorella kessleri* (ここでは単にクロレラと呼ぶ) も同様である。窒素充足培地または窒素欠乏培地に一定時間おかれたクロレラを顕微蛍光スペクトル画像と蛍光寿命画像で調べ、葉緑体活動の変化と中性脂肪の蓄積を同時かつ精密に観測することができた。

一部のシアノバクテリアは N_2 を窒素栄養源とすることができる(窒素固定)。窒素固定を行うニトロゲナーゼは酸素によって不活性化されるので酸素発生型光合成と共存することができない。糸状細胞連結型のシアノバクテリアの一部ではおよそ数個から約20個の細胞のうちの1個の細胞だけを異型細胞(ヘテロシスト)として細胞分化させ、その異型細胞でのみ窒素固定

を行い、異型細胞では酸素発生型光合成活動を低下させる。通常の栄養細胞から異型細胞が形成される数十時間という時間の間に起こる変化は劇的なものであるが、その詳細を細胞毎に調べる試みはこれまで不十分であった。この時間経過を同一細胞について約 100 時間にわたりタイムラプス顕微分光観測を実現した。異型細胞が形成する途上の光合成膜上で進行する分子構成変化の詳細が初めて明らかになった。

光合成生物における葉緑体活動は細胞全体の活動と密接に関係しており、葉緑体の生理的状态とそれと関連しながら変化していく細胞内の代謝産物の変化を知ることは重要である。本課題を通じて、通常蛍光が弱く観測しにくい光化学系 I の蛍光スペクトル観測[論文 3]や蛍光寿命観測を行い、それを光合成生物の細胞分化の研究に応用する手法を確立することができた。また非蛍光性分子を非染色で可視化するラマン散乱スペクトル測定について、自家蛍光の妨害を受けずに光合成生物から得られる技術基盤を構築した。その結果、より高速に光合成生物のラマン散乱スペクトル画像を得ることが容易になった。

(2) 詳細

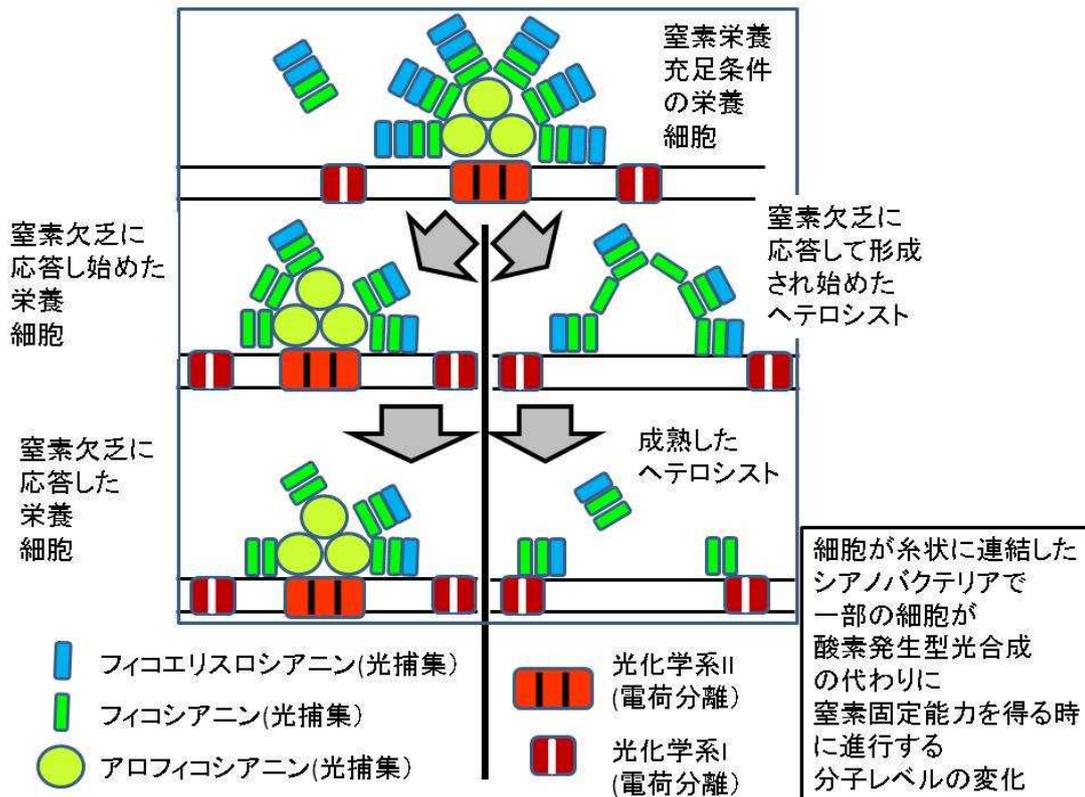
研究テーマ A「蛍光分光顕微鏡の高度化、特に蛍光寿命イメージング法の導入による、細胞内油脂と葉緑体活動の可視化」

全ての画素で蛍光スペクトルを高速に得ることができる顕微分光システムにおいて、2つの波長領域で完全同時に蛍光寿命の画像を得ることができるように顕微分光システムの増強を行った。さらに、多数の焦点面の蛍光寿命画像を自動連続的に得て、3 次元的な蛍光寿命の立体画像を得ることができるようになった。主な使用例はクロロフィル自家蛍光(約690nm)と中性脂肪を染色した色素の蛍光(例: BODIPY, 510-570 nm)を同時に得ることである。クロロフィル蛍光は主に光化学系 II の蛍光寿命を、BODIPY 蛍光強度から中性脂肪の蓄積量を見ることができ、クロレラの細胞において、窒素欠乏が引き起こす葉緑体の蛍光スペクトルと蛍光寿命の変化、および同時に進行する中性脂肪の蓄積を見た。単一細胞内の葉緑体の縮小にも関わらず蛍光スペクトルの変化は再吸収効果で説明できる程度であった。つまり、葉緑体本来の蛍光スペクトルにはほとんど変化がなく、蛍光スペクトルの僅かな変形は葉緑体の縮小により蛍光透過率の波長依存性が小さくなることで大方説明できた。一方、蛍光寿命で見ると窒素欠乏培地の細胞と窒素充足培地の細胞の間の差異を敏感に検知することができた。

また、植物などで葉緑体の分化が見られる場合、光化学系 I と光化学系 II の化学量論比が変化することがある。顕著な代表例は C4 植物における維管束鞘細胞と葉肉細胞における葉緑体の機能分化である。また糸状シアノバクテリアでも酸素発生型光合成を行う栄養細胞の一部から窒素固定細胞(ヘテロシスト)を形成する際に光化学系 II の量と活動を低下させる。しかし、光化学系 I はヘテロシストでも残存し、光化学反応を維持すると言われている。それは系 I が光エネルギーを利用した循環型電子伝達によりチラコイド膜内外のプロトン濃度勾配を作り出し、ATP を生産するためと言われている。窒素固定反応には大量の ATP が必要である。これらのように光化学系 I が残存する場合、蛍光スペクトルと蛍光寿命によって光化学系 I と光化学系 II の区別をすることが重要である。蛍光寿命顕微画像を用いてシアノバクテリアと C4 植物の両方において光化学系 I と光化学系 II の区別を細胞毎、葉緑体毎に行えることを実証した。

研究テーマ B 「光合成生物の栄養環境変化への応答と成長段階による変化の顕微分光による研究」

研究テーマAでも言及した糸状シアノバクテリアのヘテロシスト分化の研究では、最低5つの蛍光色素タンパク質の変化を追跡する必要がある。また、それら5つの蛍光スペクトルは狭い波長領域でお互いに重なっているため十分な波長分解能で顕微蛍光スペクトルを得なければ個々の細胞で進行する事象を十分な精度で記述できない。



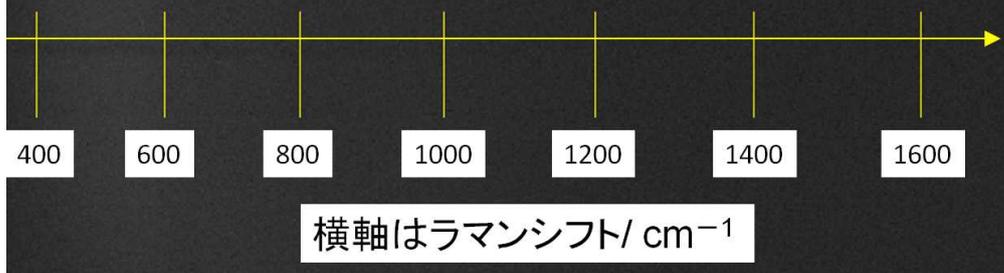
従来から開発、改良してきたライン走査蛍光スペクトル顕微鏡では、2nm の波長分解能で 500-760nm の波長領域の蛍光スペクトルを得ることができるので、このような生理現象を追跡することには最適である。88 色の蛍光画像(600 - 760nm)を同時に取得する設定で、栄養細胞がヘテロシストに変化する全過程を単一細胞毎に約 100 時間追跡することに成功した。励起には 808nm パルスレーザーの 2 光子励起と 785nm 連続発振レーザーの 1 光子励起を用いた。このパルスレーザー2 光子励起では 5 種類の色素タンパク質の全てを励起して蛍光を見ることができる。785nm 連続発振レーザー1 光子励起の場合は光化学系 I のみが実質的に励起され、光化学系 I 選択的蛍光像を見ることができる[論文 2,3]。これらの異なる励起条件、異なる細胞分化段階、窒素固定を行うようになる細胞と分化しないことが決定した細胞などの 1625 個の単一細胞蛍光スペクトルを特異値分解で統一かつ網羅的に解析することで異型細胞が形成する途上の光合成膜上で進行する分子構成変化が明らかになった[論文 1]。

研究テーマ C 「深近赤外励起ラマン散乱スペクトル測定による非蛍光性細胞構成成分分子

の検出」

微弱なラマン散乱スペクトル測定における蛍光の妨害を避けるために励起レーザーをなるべく長波長に選択することがしばしば行われる。葉緑体やシアノバクテリアでは 785nm-820nm の連続発振レーザーを用いたとしても、系 I のアンチストークス蛍光によって自家蛍光が強く発せられることが本研究課題でも正確かつ多種類の酸素発生型光合成生物で確認されている [論文 1,2,3]。このため励起光を 976nm に選んでラマン散乱スペクトル顕微鏡を構築した。励起光が長波長側になるにつれてラマン散乱断面積(観測対象分子を一定にしたときの入射光強度に対する散乱信号光の強度を表す)は急激に下がっていく。信号が弱くなる中でも高速走査を実現するためにはライン状の励起または多数焦点励起等を行って並列化を行うことが望ましい。このため自作レンズ式イメージング分光器を構築し、近赤外カメラ(0.9 - 1.6 mm で高感度)と組み合わせてラマン散乱光の観測に用いた。多細胞藻類の一種に適用して、細胞内のカロテノイドについては自家蛍光の妨害をほとんど受けずに容易に検出可能であることが実証できた。実際の細胞の観察に用いる上で広い領域を高い解像度で走査することが欠かせない。そのためには上記のような並列化を実現する必要があるが、それは現システム的设计上では励起レーザー光学系のみを改良することで直ちに実現できる状況になった。

深近赤外カメラを用いた976nm励起ラマン散乱スペクトル測定
(多細胞の緑藻の葉緑体のカロテノイドが主に見えている)
現在は単一焦点励起だが、これを多焦点励起、線状励起
にすることで高速化が実現できる。



3. 今後の展開

私の推進する顕微分光法を利用する多くの植物科学に関わる共同研究が進行中である。これらを継続発展させることで、顕微分光の強みを生かして植物科学の分野に貢献したい。

それらの植物科学に関わる共同研究の推進と並行して、本研究課題で開発、改良、構築した

多角的な顕微分光のハードウェア、ソフトウェアを益々発展させていく。短期的には励起波長の可変性で改良していく。中長期的には、単細胞生物に限定されずに、植物の奥深い内部で高い解像力を実現しながら顕微分光が行えるようにする方針である。

4. 評価

(1) 自己評価

当初、研究対象生物を、中性脂肪を蓄積する緑藻に絞っていた。しかし、さきがけ研究を遂行しながら、顕微分光システムと解析ソフトウェアの多角化と高機能化が進行した。また私自身の光合成生物学の知識がわずかなりとも広く、深くなり、共同研究の申し込みが増えたことで、研究対象生物や生理現象が大きく広がった。研究期間中の経験で、顕微分光システムの性能だけ追求する段階から、光合成が関わる幅広い生理現象に顕微分光を適用する研究姿勢に移行できたと思っている。窒素欠乏が引き起こす緑藻細胞中の中性脂肪の蓄積は一種のストレス応答であり、窒素欠乏が長引けばやがては細胞死に至る途中の過渡現象である。それはバイオ燃料を生み出すという立場では重要ではあるが、緑藻の生命力の限界を示している。それとは対照的に、窒素欠乏を窒素固定能力で克服できるシアノバクテリアという存在と能力は特筆するに値する。根粒細菌等、ごく限定的な生物種のみが窒素固定能力を持つ。酸素発生型光合成と窒素固定能力を併せ持つシアノバクテリアの機能や細胞分化を示す細胞形態・生態には人類が学ぶべき要素が非常に多い。そういう高機能なシアノバクテリアの有名な生理現象において生理学的現象を分子レベルで記述することに顕微分光分析が役に立ったということには達成感を感じてよいのではないかと思っている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

近年、藻類を用いてバイオ燃料を生産しようとする試みが注目される一方で、エネルギー収支の視点からは正味のエネルギー生産は達成できていない現状で、多くの研究努力が望まれている。

熊崎茂一博士は、自身の超高速計測技術、顕微分光技術、に関する先端的研究実績を基礎に非破壊型リアルタイム分析、空間・時間分解分光分析手法を生体材料観察、解析に適用し得る手法を開発するという意欲的研究提案を行い採択された。研究開始後、若干の誘導期間はあったが、光合成生物の研究に適合した顕微蛍光減衰測定、顕微蛍光スペクトル測定、顕微ラマン散乱スペクトル測定系の開発に成功した。

具体的な測定事例としては、クロレラを顕微蛍光スペクトル画像と蛍光寿命画像で調べ、葉緑体活動の変化と中性脂肪の蓄積を同時かつ精密に観測することに成功している。また、窒素固定能力を持つ異形細胞(ヘテロシスト)が数十時間の間に通常の栄養細胞から形成される過程をリアルタイムで、同一細胞について約 100 時間にわたりタイムラプス顕微分光観測を実現した。2nm の波長分解能を有するライン走査蛍光スペクトル顕微鏡と網羅的スペクトル解析、およびユニークな近赤外励起により狭い波長領域に混在する多種類の色素タンパク質

の増減を分離観測することに成功している。

また光合成生物組織中の非蛍光性分子をラマン散乱スペクトルにより可視化する技術基盤の構築にも貢献した。生体材料に適用可能な非破壊リアルタイム顕微分光システムの構築と実試料の観測例について、今後は、いっそうの論文発表の形で示すことにより、大きい波及効果を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Shigeichi Kumazaki*, Masashi Akari and Makoto Hasegawa "Transformation of Thylakoid Membranes during Differentiation from Vegetative Cell into Heterocyst Visualized by Microscopic Spectral Imaging", Plant Physiology, (2013) 161, 1321 – 1333 |
| 2. Shigeichi Kumazaki* "Anti-Stokes fluorescence of oxazine 1 in solution with continuous wave laser excitation at 785 nm", Chemical Physics (2013), 419, 107-112. |
| 3. Makoto Hasegawa, Takahiko Yoshida, Mitsunori Yabuta, Masahide Terazima and Shigeichi Kumazaki*, "Anti-Stokes Fluorescence Spectra of Chloroplasts in Parachlorella kessleri and Maize at Room Temperature as Characterized by Near Infrared Continuous Wave Laser Fluorescence Microscopy and Absorption Microscopy" Journal of Physical Chemistry B, (2011) 115, 4184 – 4194. |
| |
| |

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1) *熊崎茂一 長谷川慎

“ライン走査型 2 光子励起蛍光スペクトル顕微鏡を用いた植物細胞中の葉緑体内部微細構造観察” 分光研究 (2011), vol. 60, No.1, pp19-21.

2) 熊崎茂一

“アンチストークス蛍光スペクトルと 2 光子励起蛍光スペクトルによる光合成膜の顕微分光分析” 生物物理(2011) Vol. 51(6), 274-275.

研究報告書

「分子性酸化物を用いた高効率な水の完全酸化触媒の創生」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 定金 正洋

1. 研究のねらい

太陽光エネルギーを用いて水を水素と酸素に分解する反応は、真にクリーンな水素エネルギーを得る究極の方法である。この人工光合成システム構築のために解決すべき現在一番の課題は、水を酸素に酸化する反応の効率が低いことである。この反応系で水は唯一の電子供与物質であり、水の完全酸化反応を効率よく進める触媒の開発が急務となっている。

現在、ルテニウムやマンガンなどの有機金属錯体や酸化コバルトや酸化鉄などの金属酸化物など、均一系および不均一系触媒を用いた水の完全酸化反応についての研究が世界中で進められている。

均一系触媒は、その構造や物性の分析が容易で、反応機構の検討も可能である。更に、有機配位子の構造を変えることにより触媒の最適化が可能であるという利点を持つ。しかしながら、有機分子は酸化条件下では必ず分解されるため、安定性の問題がある。一方、不均一系触媒は安定性が高いという利点を有するが、金属酸化物の細かい物性の制御は難しい。

近年、金属酸化物でありながら分子であるポリオキシメタレートとよばれる化合物が水の完全酸化触媒として注目を集めている。ルテニウム-酸素4核クラスター有するポリオキシメタレートである $[\text{Ru}_4\text{O}_4(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36})_2]^{10-}$ が水の完全酸化触媒として優れていることが Emory 大学の Hill らと Padova 大学の Bonchio らによって報告されている(*J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7522 など)。さらに、Hill らはコバルト-酸素4核クラスターを有するポリオキシメタレート $[\text{Co}_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{PW}_9\text{O}_{34})_2]^{10-}$ が水を完全酸化する触媒であることを報告した(*Science*, **2010**, *328*, 342 など)。これらの例では、活性中心はルテニウムまたはコバルト上にあり、タングステン-酸素ユニットは活性中心を安定化する配位子である。

このポリオキシメタレートは、金属酸化物であるため高い酸化安定性を有する。また、均一系触媒であるため様々な分光学的分析が可能であり、触媒活性機構の詳しい考察も可能である。また、分子構造を変えることにより分子設計も可能である。本研究では、これらの利点を利用して優れた水の完全酸化触媒を開発する。

2. 研究成果

(1) 概要

金属酸化物分子(ポリオキシメタレート)を用いた水の完全酸化触媒を見出し、その触媒機構を理解し、ポリオキシメタレートを用いた水の完全酸化触媒設計法を確立するために、3つの研究テーマ(研究テーマ A「水の酸化触媒活性を示すポリオキシメタレートの探査」、研究テーマ B「ポリオキシメタレートを用いた水の酸化触媒機構の解析」、研究テーマ C「新規ポリオキシメタレート化合物の合成と構造解析」)を連携してすすめた。

まず、研究テーマ A として、これまでに既知の様々なポリオキシメタレートの水の酸化触媒

活性を調べた。その結果、1つのルテニウムをポリオキシメタレート分子内に持つ、単核ルテニウム置換ケギン型ポリオキシメタレートが水の酸化触媒活性を持つことを見出した。また、この単核ルテニウム置換ケギン型ポリオキシメタレートが μ オキシ架橋して生成する2量化合物がより高い活性を持つことを見出した。

更なる高活性触媒の探査を目的として、様々な種類のポリオキシメタレートと様々な種類のルテニウム原料と様々な合成条件下反応させ、生成する化合物の水の酸化触媒活性を調べた。その結果、更に高活性を示す新規触媒を見出した。

研究テーマ B として、単核ルテニウム置換ケギン型ポリオキシメタレートが μ オキシ架橋して生成する2量化合物の水の酸化触媒機構を調べた結果、この2量化合物は分解することなく水の酸化触媒活性を示すことを明らかにした。

また、更に高活性を示す新規触媒がポリオキシメタレートで安定化された酸化ルテニウムナノ粒子であることを見出した。

テーマCとして新しいポリオキシメタレート材料の合成と構造解析を行いました。その結果、1つのルテニウムを分子骨格中にもつドーソン型ポリオキシメタレートの合成および構造解析に成功し、これが水の酸化触媒活性を示すことを明らかにした。また、1つのルテニウムを分子骨格中にもつケギン型ポリオキシメタレートの新しい合成法も見出した。

また、様々な内包金属を有するプレースラー型ポリオキシメタレートの合成と構造解析、ルテニウムを骨格外に持つポリオキシメタレートの合成と構造解析、および完全無機のポリオキシメタレートとしては初めて結晶構造中にマイクロ細孔を持ち、イオン交換特性および酸触媒活性を示す新規ポリオキシメタレート材料の合成と構造解析にも成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A「水の酸化触媒活性を示すポリオキシメタレートの探査」

A-1. 既存のポリオキシメタレートのスクリーニング

図1に示す様々な既存のポリオキシメタレートを合成し、水の酸化触媒活性を調べた。

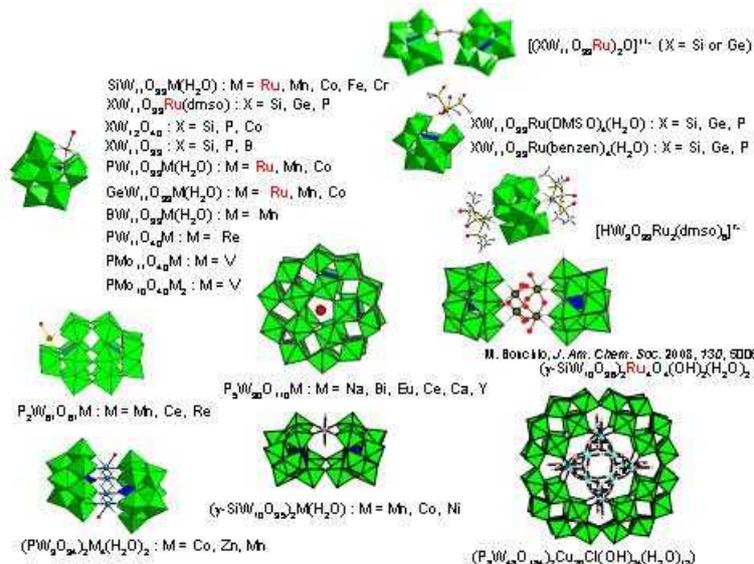


図1. スクリーニングしたポリオキシメタレート

まず、4 価のセリウム酸化剤である Cerium(IV) ammonium nitrate (GAN)を酸化剤として用いてスクリーニングを行ったところ、分子骨格中にルテニウムを有する単核ルテニウム置換ケギン型ポリオキソメタレート(図2. 右)が活性を示した(原著論文4)。さらに、興味深いことにルテニウムが μ 酸素で架橋した 2 量体(図2. 左)は更に高い活性を示した。

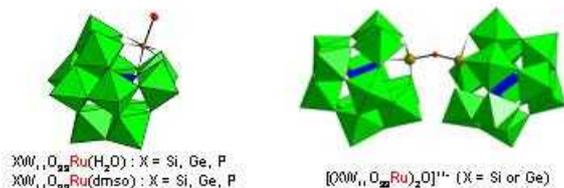


図2. GAN を酸化剤としたときに水の酸化触媒活性を示したルテニウムを骨格内に持つポリオキソメタレート(左)単核ルテニウム置換ケギン型ポリオキソメタレート(右)単核ルテニウム置換ケギン型ポリオキソメタレートが μ 酸素で架橋した 2 量体

A-2. 水の酸化触媒活性を持つ新規ルテニウム含有ポリオキソメタレートの探査

ルテニウムを骨格内に有するポリオキソメタレートが高い水の触媒活性を示すことが明らかとなった。そこで、ルテニウムを有する新規ポリオキソメタレート触媒の探査を行った。ルテニウムを含むポリオキソメタレートの合成は難しく、様々な構造異性体の混ざり物や、構造が不明な不純物を多く含むことが一般的である。このことを逆手に取り、水の酸化触媒として有用なポリオキソメタレートのスクリーニングを行った。様々なポリオキソメタレート原料と様々なルテニウム原料を、様々な反応温度で反応させ、ポリオキソメタレート材料を作成し、水の酸化反応に対する活性を見て行った。検討の結果、2 つのポリオキソメタレート(ドーソン型リンタングステートから3つのタングステンを外したものとケギン型ゲルマノタングステートから3つのタングステンを外したもの)とある種のルテニウム原料をある温度で反応させると非常に触媒活性の高い固体が得られることを見出した。

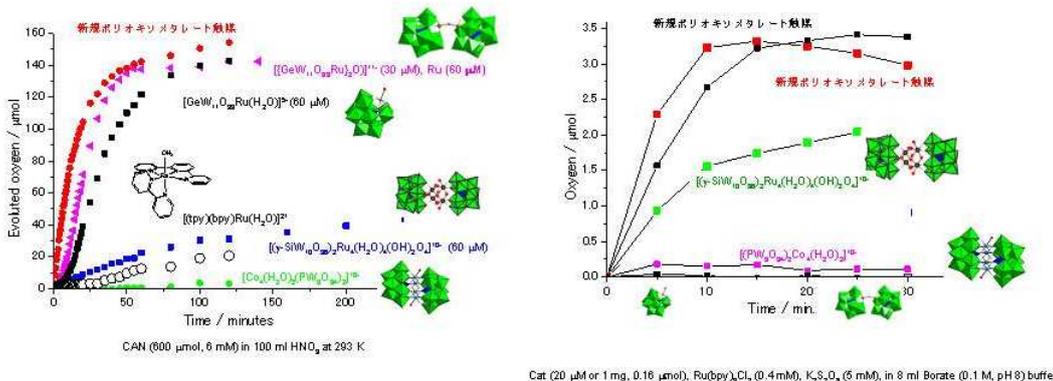


図3. 水の酸化反応に高い触媒活性を示す新規ポリオキソメタレート材料の水の酸化触媒活性(左)GANを酸化剤として用いたときの酸素発生量、(右)光励起して合成した[Ru(III)(bpy)₃]³⁺を酸化剤として用いたときの酸素発生量。新規ポリオキソメタレート(赤丸)、その他の水の酸化触媒活性を示すポリオキソメタレートを他の色で表す。

この新規ポリオキソメタレート材料を触媒として用い、CAN または光励起により発生させた 3 価のルテニウム錯体([Ru(III)(bpy₃)³⁺]を酸化剤として用いた水の酸化反応結果を図 3 に示す。どちらの酸化剤を用いたときもこれまでに報告のあるルテニウム 4 核ポリオキソメタレート (Bonchio-Hill 触媒)、コバルト 4 核ポリオキソメタレート(Hill 触媒)、ルテニウムが μ 酸素で架橋した 2 量体、さらに代表的な有機ルテニウム錯体である[Ru(bpy)(tpy)(H₂O)]ⁿ⁺よりも優れた触媒活性を示した。

研究テーマ B「ポリオキソメタレートを用いた水の酸化触媒機構の解析」

テーマ A での触媒スクリーニングの結果、これまでに報告のない触媒 2 つの触媒機構の解析と構造解析を行った。

B-1. ルテニウムが μ 酸素で架橋した 2 量体の触媒機構

ルテニウムが μ 酸素で架橋した 2 量体は CAN を触媒としたときに水の酸化触媒活性を示す。2 量化物は 2 量化する前の単量体に比べて同じルテニウム量あたりで高い活性を示す。また、2 量化物と単量体を触媒として用いたときの酸化剤濃度の反応速度依存性は異なることを見出した。このことは 2 量体と単量体で機構が異なることを示している。また、2 量体は単量体に比べて 1 分子当たり多くの電子を授受でき、これが高い水の酸化活性に起因していることを明らかにした。

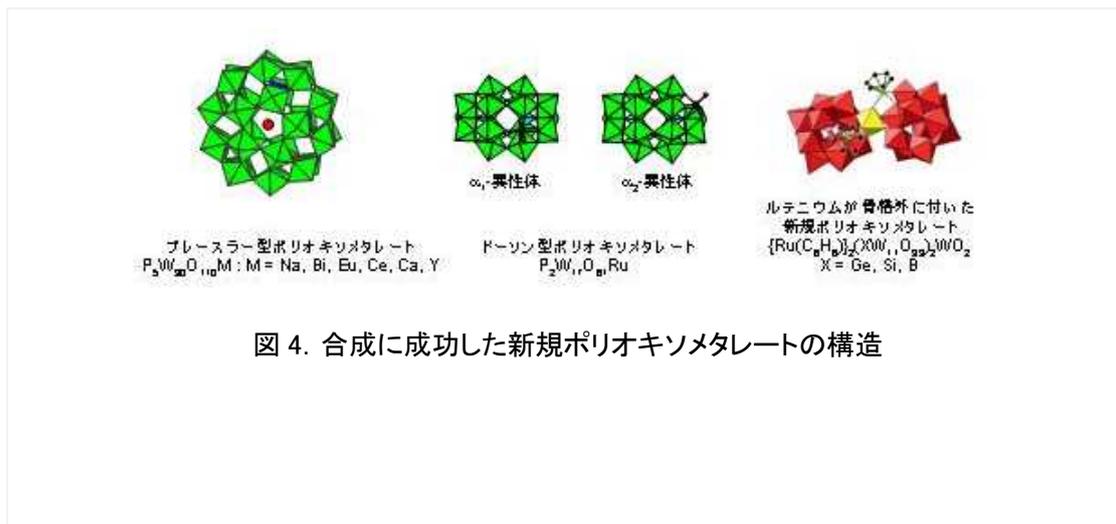
B-2. 新規ポリオキソメタレート材料の構造解析

高い水の触媒活性を示す新規ポリオキソメタレートを、粉末XRD、DLS、IR、CV、P-NMR、TEMにより分析したところ、この材料がポリオキソメタレートで安定化された酸化ルテニウムナノ粒子であることを明らかにした。

研究テーマ C「新規ポリオキソメタレート化合物の合成と構造解析」

新しいポリオキソメタレートの合成法の開発に取り組み様々な新規ポリオキソメタレートの合成と構造解析に成功した(図4)。

ルテニウムを 1 つ分子骨格内に持つ新規ポリオキソメタレートとして、単ルテニウム置換ドソン型ポリオキソメタレートの 2 つの異性体の合成、構造解析に成功した。また、この分子が水の酸化触媒活性を示すことも見出した。更に、1 つのルテニウムを分子骨格中にもつケギン型ポリオキソメタレートの新しい合成法も見出しました(原著論文 2-5)。また、様々な内包金属を有するプレスラー型ポリオキソメタレートの合成と構造解析、ルテニウムを骨格外に持つポリオキソメタレートの合成と構造解析、および完全無機のポリオキソメタレートとしては初めて結晶構造中にマイクロ細孔を持ち、イオン交換特性および酸触媒活性を示す新規ポリオキソメタレート材料の合成と構造解析にも成功した(原著論文 1)。



3. 今後の展開

ポリオキソメタレートを用いて更に高活性な水の酸化触媒の開発を行うとともに、光吸収材料、還元触媒などと接合させ、太陽の光エネルギーをつかって水を水素と酸素に分解できる人工光合成システムへ展開する。

4. 評価

(1) 自己評価

太陽光エネルギーを用いて水を水素と酸素に分解する人工光合成システム構築のために現在一番の課題は、水を酸素に酸化する反応の効率を高める触媒の開発である。

ポリオキソメタレートを用いて水の酸化触媒の開発を行った結果、2つの新しい発見をした。これは太陽の光エネルギーを用いて水から水素などを得る人工光合成システム構築に貢献できる重要な結果であると確信している。

1) μ 酸素で架橋されたルテニウム 2 量体が壊れることなく水の酸化触媒活性を示した。 μ 酸素で架橋されたルテニウム 2 量体としては Meyer らのピピリジン系錯体が有名であるが、Meyer らのルテニウム錯体は 2 つのルテニウムに水がそれぞれ配位しており、これが水の酸化に重要とされてきた。一方、私が見いだした μ 酸素で架橋されたルテニウム 2 量体はルテニウムに μ 酸素以外の配位している酸素はすべてポリオキソメタレート骨格中の酸素であり、水は配位していない。このようなルテニウム配位環境で水の酸化が起こったことは、初めての報告であり、今後の水の酸化触媒設計に役に立つ。

2) また、これまで報告あるポリオキソメタレートや有機ルテニウム錯体を超える高い触媒活性を示す新しい水の酸化触媒を見出した。今後、半導体などの光触媒と効率よく組み合わせることができれば、新しい水分解光触媒の開発に貢献できる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

人工光合成の実現への最も大きい解決すべきボトルネック課題は、水分子の酸化活性化である。いかにして有効に水分子から電子を汲み出すかである。特に、その過程中いかにして耐久性のある触媒系が実現できるかが喫緊の課題となっている。

定金正洋博士は、自身のポリオキソメタレート触媒開発の実績を基礎に、耐久性のある高効率な水の酸化触媒開発について意欲的な研究提案を行い採択された。研究開始後、若干の誘導期間が見られたが、研究期間内に見事に、世界最高の触媒効率を有する新規触媒の開発に成功した。

具体的には2つのポリオキソメタレート(ドーソン型リンタングステートから3つのタングステンを外したものとケギン型ゲルマノタングステートから3つのタングステンを外したものの)の化学処理により非常に触媒活性の高い固体が得られることを見出した。この新規ポリオキソメタレート材料を触媒として用い、化学酸化および光励起による酸化方法の両方で水の酸化これまでに報告のある触媒に比して優れた触媒活性を示すことを見出している。

水の酸化触媒は人工光合成のキーポイントであるので、今後の一層の研究展開に期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Z. Zhang, M. Sadakane*, T. Murayama, S. Izumi, N. Yasuda, N. Sakaguchi, W. Ueda*, "Tetrahedral connection of α -Keggin-type polyoxometalates to form an all-inorganic octahedral molecular sieve with an intrinsic 3D pore system", *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 903-911.
2. S. Ogo, S. Moroi, T. Ueda, K. Komaguchi, S. Hayakawa, Y. Ide, T. Sano, M. Sadakane* "Preparation and structural characterization of tetrabutylammonium salt of mono-ruthenium(III)-substituted α -Keggin-type silicotungstates with 4,4'-bipyridine ligand and its electrochemical behaviour in organic solvents", *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 7190-7195.
3. S. Ogo, N. Shimizu, T. Ozeki, Y. Kobayashi, Y. Ide, T. Sano, M. Sadakane*, "Determination of α -Keggin structure of $[\text{GeW}_{11}\text{O}_{39}\text{Ru}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})]^{5-}$. Reaction of mono-substituted Keggin-type germanotungstate $[\text{GeW}_{11}\text{O}_{39}\text{Ru}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{O})]^{5-}$ with dimethyl sulfoxide to form $[\text{GeW}_{11}\text{O}_{39}\text{Ru}^{\text{III}}(\text{dmsO})]^{5-}$ and their structural characterization.", *Dalton Tran.* **2013**, *42*, 2540-2545.
4. S. Ogo, M. Miyamoto, Y. Ide, T. Sano, M. Sadakane*, "Hydrothermal and Solid-state Transformation of Ruthenium-supported Keggin-type Heteropolytungstates $[\text{XW}_{11}\text{O}_{39}\{\text{Ru}(\text{II})(\text{benzene})(\text{H}_2\text{O})\}]^{n-}$ (X = P (n = 5), Si (n = 6), Ge (n = 6)) to Ruthenium-substituted Keggin-type Heteropolytungstates", *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 9901-9997.
5. M. Sadakane*, S. Moroi, Y. Iimuro, N. Izarova, U. Kortz, S. Hayakawa, K. Kato, S. Ogo, Y. Ide,

W. Ueda, T. Sano, “Stabilization of high valence ruthenium in silicotungstate ligand. Preparation, structural characterization, and redox studies of ruthenium(III) substituted α -Keggin-type silicotungstates with pyridine ligands, $[\text{SiW}_{11}\text{O}_{39}\text{Ru}^{\text{III}}(\text{Py})]^{5-}$.”, *Chem. Asian-J.* **2012**, 7, 1331–1339.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

アウトリーチ活動

- 1) JST サイエンスカフェ～水と光とエネルギー～ 平成 24 年 12 月 2 日
場所: 賀茂泉酒造株式会社 和泉館

著作物

- 1) 「ヘテロポリ酸の電子とプロトン受容能を利用した水素吸蔵と水素生成」
定金正洋、「触媒」誌、トピックス、**2013**, 55, 5, 329.

2) “Heteropoly compounds”

Vol. 7 Surface Inorganic Chemistry and metal-based catalysis, 7. Catalysis by Oxides,
7.19 Heteropoly compounds in Comprehensive Inorganic Chemistry II, editors: Jan
Reedijk and Kenneth Poepelmeier, Oxford, UK, Elsevier, **2013**, 185–204.
Y. Kamiya, M. Sadakane, W. Ueda

招待および依頼講演等

- 1) “Catalytic activity of α -oxo dimer of mono-ruthenium substituted α -Keggin-type
heteropolytungstates for water oxidation”
4–6. March, 2013, 2012 OCARINA Annual International Meeting
Osaka City University, Osaka, 5. March, 2013

2)「ポリオキソメタレートを用いた水酸化触媒の開発」

2012 年度 触媒学会北海道支部 札幌講演会
北海道大学 工学部 B3-102、2012 年 12 月 7 日(金)

3)「Redox Behavior of Polyoxometalate, Anionic Metal Oxide Molecules」

62nd JSCC Symposium, Mini-Symposia S6 “Metal Complexes Involved in Multi-Step
Electron Transfer Reaction”
富山大学、9 月 21 日(2012) 錯体討論会、ミニシンポ

- 4)「ポリオキソメタレートによる新しい機能性材料の開発」
触媒学会西日本地区 広島地区講演会、11月15日(2011)広島大学
- 5)「ポリオキソメタレートを使った新しい機能性材料の開発」
第5回 中国四国若手 CE 合宿、化学工学会中国四国支部 若手の会、9月9-10日
(2011)、広島県安芸グランドホテル
- 6) “Porous metal oxide materials prepared using polyoxometalates”
Pacifichem 2010, New Frontiers in Polyoxometalate Chemistry, 18th December, 2010,
Honolulu, USA.

研究報告書

「光アンテナにナノ粒子や分子を集める・観る・反応させる」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 坪井 泰之

1. 研究のねらい

本研究では、貴金属ナノギャップ空間(=光ナノアンテナ)に光子ばかりではなく、そこに分子や触媒微粒子をも捕集・捕捉して、ナノ空間に「光子」と「分子系・反応物質」を同時に局在させ、両者を直接カップルさせ光反応を起こす、全く新しい反応場の概念を提出する。

すなわち、光ナノアンテナにおいて、「光子」とこれら「反応する物質」を同時に同じナノ空間に同時に局在した状態を作り出すことを実現し、これらが互いに強制的に出会うことにより、相互作用(反応物質の光吸収)のチャンスを著しく増大させる。その結果として光反応の効率は飛躍的に増大できるような、全く新しい概念に基づく高効率な光反応システムを構築することを目指す。

そして、このような貴金属ナノギャップ空間(光ナノアンテナ)における光化学反応の実現へのキーエッセンスを全て洗い出し、分子捕捉法を導入したプラズモン光化学を世界にさきがけることを大きな目的とする。

より詳しく述べると、本来、光(光子)と分子の相互作用の確率(吸収の確率)は大きなものではない。分子はナノメートルのサイズを持つ一方で、光子はその回折限界のため、せいぜい数100 nm 程度の大きさまでしか局在できない。高い効率を持つ「光—物質エネルギー変換システム」を構築するには、この「光と物質の相互作用の初期段階」を今一度考える必要がある。本領域の趣旨である「光エネルギーの化学変換」に向けて、有力と思われるアプローチの一つに「高効率な光捕集」が挙げられる。本研究では貴金属ナノギャップに基づく光アンテナの増強放射力を利用して、アンテナに光子だけでなく機能性ナノ粒子や分子を集め、分子・粒子と光子をナノ空間で直接カップルさせ、エネルギーロスなく反応に導く、全く新しい概念に基づく反応場を提案する。

このような貴金属ナノギャップ空間(=光ナノアンテナ)に光子ばかりではなく、そこに分子や触媒微粒子をも捕集・捕捉して、ナノ空間に「光子」と「分子系・反応物質」を同時に局在させ、両者を直接カップルさせ光反応を起こす、全く新しい反応場の構築を目指し、3年間研究を推進した。

2. 研究成果

(1) 概要

金属内の自由電子の共同的なプラズマ振動をプラズモンと呼ぶ。微細な構造を有する金属表面や、極めて小さい金属微粒子に共鳴励起光を照射すると(Localized Surface Plasmon, LSP 共鳴), 貴金属表面には入射光が増強した電場が局在化する(電場増強効果)。特に、ナノギャップ構造(プラズモニック光アンテナ)は、その著しい光電場増強能に基づき放射力も増

強し、ナノ粒子をナノギャップ近傍に効率よく捕捉できることがある(図1・左 にその概念図を示した)。このようプラズモニック光ピンセットは、従来の集光レーザービームを用いた光ピンセットに比べ、①安定な捕捉に必要な光強度がおよそ一万分の一程度で済む、②捕捉の空間分解能が回折限界よりもはるかに小さいナノギャップのサイズにまで小さくすることができる、などの大きな利点を有する。しかし、その実験的研究は 2008 年に報告されて以来、まだ極めて少ない。プラズモン光ピンセットの確立に向け、学術的に理解されなければならないことも、技術的に乗り越えなければならないことも多い。これをデザインし、図1右のように分子系の光アンテナへの光捕捉を目指し、以下詳述する研究を展開した。

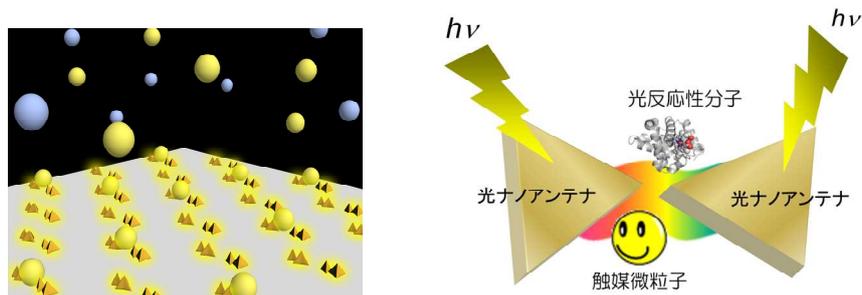


図1： プラズモン光ピンセットの概念図(左)と、それに基づく光反応場の構築の概念図(右)

(2) 詳細

研究テーマA 「新型プラズモン光捕捉・顕微分計測装置システムの制作」

本さがけで取り組んだ分野は若い分、競争もし烈であり、研究を迅速に遂行するためには実験ブースを増やすことが実践的だと考えた。そこで、研究者が所有していた倒立型光学顕微鏡に対し、光源(近赤外域発信の小型 LD)や小型フェムト秒パルスレーザー、光学部品を適宜購入し、光捕捉を実現し、その挙動を高感度・高精度かつ空間選択的に(共焦点型光学配置による)にナノ空間を分光計測できるシステムを新たに構築した。この装置の写真を図2に示すが、以下の研究の推進に大きく役に立った。

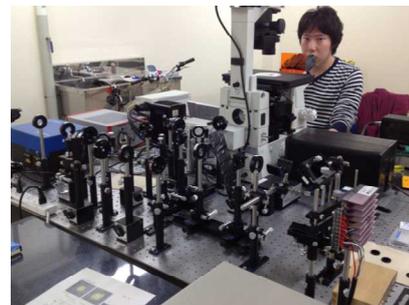


図2： 新しく構築した光捕捉・顕微分光システム

研究テーマB 「ソフトな鎖状高分子の捕捉の実現と輻射圧や非平衡場の定量評価」

光合成反応系はタンパク質や巨大高分子などのソフトな物質より構成されている。そこで、このようなソフトマター系のプラズモン光捕捉は、本課題の推進の第一段階として大変重要である。本研究では ポリアクリルアミド系の鎖状高分子を捕捉のモデル化合物に選び、その光捕捉に初めて成功した(図2 左、M. Toshimitsu et al. and Y. Tsuboi, *J. Phys. Chem. C* Vol. 116, No. 27 (2012) 14610-14618.)。また、この際のプラズモン増強輻射圧を定量的に評価でき、ソフトな分子系の捕捉の特徴を詳細に解明できた。同時に、光励起による光ナノアンテナの発熱を観測し、温度上昇を定量的に評価し(H. Yamauchi, Y. Tsuboi et al. and S. Ito, *J. Phys. Chem. C* Vol. 117, No. 16 (2013) pp. 8388-8396.)、巨大な温度勾配に起因する熱泳動力も定量的に評価できた。このような複合的な作用により、高分子はマイクロパターンを自発的に描きながら光捕捉される全く新しい現象を発見することもできた。

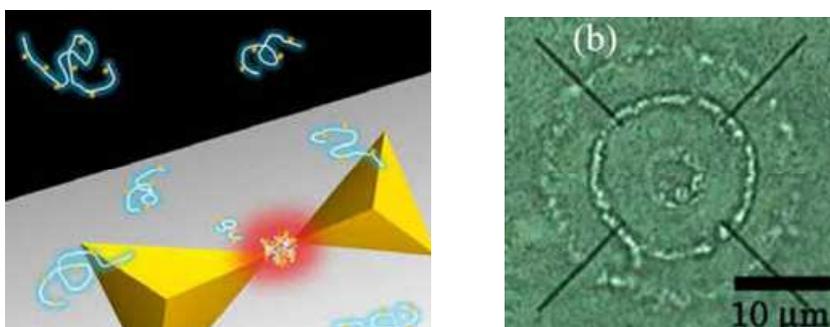


図3： 光ナノアンテナに捕捉される直鎖高分子（左）や、そこに見られる非平衡場におけるパターン形成（右）

研究テーマC 「光共鳴効果を利用した輻射圧の増強と高効率捕捉の実現」

輻射圧を発生させる光が捕捉対象物の電子遷移を共鳴励起すると、輻射圧が著しく増強されることを大阪府立大の石原 一教授らが理論的に提唱している。共鳴励起の場合、分極が大きくなること、そして光子運動量のやり取り(変化)も大きくなることから、この光共鳴条件下の輻射圧の増大は直観的に理解される。またこれは、ミクロナ量子情報がマクロな力学的運動に転写される効果の一つとして、とても興味深い現象であると考えている。本さがけではこの光共鳴効果の実験的検証を行い、集光レーザービーム型によるミオグロビンの光捕捉(T. Shoji et al. and Y. Tsuboi, *J. Phys. Chem. C* Vol. 117, No. 20 (2013), pp. 10691-10697.) や 高分子微粒子の光ナノアンテナへのプラズモン光捕捉に対して(T. Shoji et al. and Y. Tsuboi, *Jpn. J. Appl. Phys.* Vol. 51, No. 9 (2012) 092001.(Spot Light Paper))、このような光共鳴効果に基づく高効率光捕捉が実現できることをつきとめ、同時に理論的考察も行った。離散双極子近似法(DDA)による共鳴効果の大きさは実験挙動をよく説明し、このような光共鳴捕捉法の有用性を初めて示すことができた。このような光共鳴効果は、輻射圧の増大だけでなく、選択的捕捉の可能性を拓くものとして重要である。

研究テーマD 「フェムト秒プラズモン光ピンセットの開発」

詳細は省略するが、一連の研究において、プラズモンを励起する光を「定常光」ではなく「短パルス光」にすれば、光捕捉の挙動を制御・向上できるのではないかと思いついた。捕捉実験によく用いられる剛体球型の微粒子ではフェムト秒パルス光励起により 2 倍程度捕捉効率が向上した。一方、このような短パルス励起の効果が劇的に表れたのは、生体高分子の一つである DNA である。

励起モードを連続光とフェムト秒パルス光とに切り替えることにより、DNA をマイクロパターン固定したり(図4)、キャッチ & リリースしたりと、自由度の高い光マニピュレーションを実現でき、有機分子系に対する光ピンセット可能性を一段と広げることができた(T. Shoji et al. and Y. Tsuboi, *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 135, No. 17 (2013) 135, 6643–6648.)。

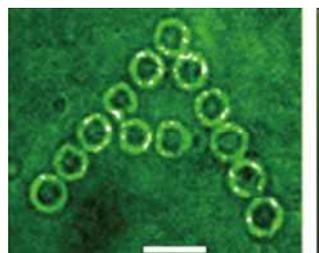


図4 DNAの自在捕捉とマイクロパターンニング

研究テーマE 発光性タンパク質LH1-RCの光捕捉

同じさきがけ研究領域に所属する名古屋工業大学の出羽毅久准教授に協力いただき、発光性のタンパク質LH1-RC試料をご提供いただいた。この試料は近赤外に蛍光を示す。現在、近赤外蛍光計測装置を立ち上げ、この試料の顕微蛍光スペクトルを測定できるところまで行っている。この装置で、現在LH1-RC試料の光捕捉を行ったところ、図5のように、プラズモン励起に呼応し、ナノアンテナ近傍からのLH1の発光強度は明瞭に可逆的な増減を示した。蛍光強度は光ナノアンテナ近傍におけるLH1系の濃度を表していると考えられ、本研究で提案した手法により光合成タンパク質LH1の光捕捉を実現したと考えられる。

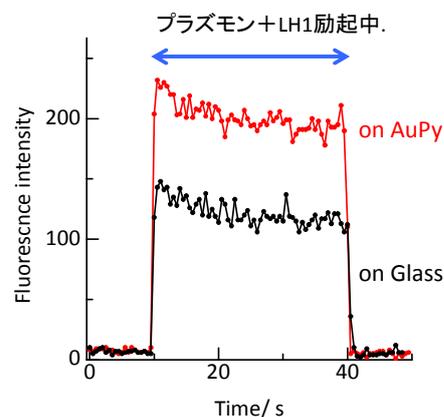


図5: 蛍光強度で観るLH1光捕捉の挙動

この他、単一分子蛍光計測法による束縛分子の観察なども行い(T. Tada et al. and Y. Tsuboi, *J. Phys. Chem. C* Vol. 117, No. 20 (2013) 10818–10824.)、研究目標のうち「……集める・観る」までは相当の進展を遂げることができた。

3. 今後の展開

プラズモン光ピンセットに関し、化学のセンスで分子系にチャレンジしているのは坪井を中心とした共同研究者グループだけと言ってよい。パルス励起、光共鳴法の導入などにより、輻射圧を増強し、ソフトな生体分子系の光捕捉もほぼ達成できた(ただし、低分子はまだ不可能)。本手法による分子マニピュレーション法が実現することで、プラズモニクスと組み合わせた高感度分光分析やバイオセンシング、光化学反応の高効率化、新しい表明光化学反応の探索などの発展が期待できる。特に、LH1-RCの光捕捉と光電変換へのプラズモンアンテナ効果は、上述の通りあと少しまで来ており、プラズモン光ピンセットの基づく高効率な光化学反応場の構築は、その背中が見えてきたと言える。光触媒微粒子系による水分解反応への応用も、今後のチャレンジとして興味深いと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

プラズモン光ピンセットの研究は非常に若い学術分野で、坪井 さきがけ研究の観点としては研究テーマ名の「光アンテナにナノ粒子や分子を集める・観る・反応させる」に沿い、(i) ナノアンテナへの「分子(タンパク質などのソフトな鎖状高分子)」の捕捉を実現する(=集める)、(ii) そのような光捕捉の挙動を分光学的に追跡できる手法を確立する(=観る)、(iii) 実際に光合成反応系に近い分子系を光ナノアンテナに捕捉し、反応性の向上を確認する(=反応させる)、の三つを常に心がけた。

成果を端的に述べると、(i) と (ii) に関しては当初の目的をほぼ完遂した。(iii) に関しては、志半ばというのは残念であるが、成果公表まで含めると、当初の目的にそった研究をブレることなく行い、世界からも注目される研究を推進できたと考える。(iii)に関しては、今後の努力と工夫を怠らず推進したい。

(2) 研究総括評価 (本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

人工光合成の実現に向けて解決すべきボトルネック課題のうち、光捕集方法の開発は殆ど未開拓と言って良い状況にある。太陽光の非常に小さい光子束密度条件をいかにして克服するかは最も重要な解決課題である。坪井泰之博士は自身の先端的光化学研究の実績を基礎に分子系を捕捉し、観測し、さらに光を集めて反応させ得る反応場として、貴金属ナノギャップに着目し意欲的な研究提案を行い採択された。

貴金属ナノギャップに誘起される局在表面プラズモン共鳴により誘起される超強電場増幅効果は光の捕集に加えて、光を吸収する分子系を捕集する相乗効果が期待できることから、極めて興味深い研究目標と評価できる。さきがけ研究開始と同時に、次々と、微粒子、高分子系化合物をはじめ、「捕捉し」、「観察する」ことに成功している。現象論的な報告にとどまることなく現象の学理の解明にも挑戦している。さらに進んでは、さきがけ研究者との共同研究により光合成光捕集系のナノギャップへの取り込みにも挑戦しておりその積極的な研究姿勢は高く評価できる。今後も、プラズモン共鳴の化学を先導するいっそうの研究努力に期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. “Acceleration of a Photochromic Ring-Opening Reaction of Diarylethene Derivatives by Excitation of Localized Surface Plasmon”
Yasuyuki Tsuboi, Ryosuke Shimizu, Tatsuya Shoji, and Noboru Kitamura
J. Photochem. Photobiol. A. Chem. Vol.221 (2011) 250-255.

2. “Metallic-Nanostructure-Enhanced Optical Trapping of Flexible Polymer Chains in

Aqueous Solution as Revealed by Confocal Fluorescence Microspectroscopy”
 Mariko Toshimitsu¹, Yuriko Matsumura, Tatsuya Shoji, Noboru Kitamura, Mai Takase, Kei Murakoshi, Hiroaki Yamauchi, Syoji Ito, Hiroshi Miyasaka, Atsushi Nobuhiro, Yoshihiko Mizumoto, Hajime Ishihara, and Yasuyuki Tsuboi
J. Phys. Chem. C Vol. 116, No. 27 (2012) 14610–14618.

3. “Plasmon–Based Optical Trapping of Polymer Nano–Spheres as Explored by Confocal Fluorescence Microspectroscopy: A Possible Mechanism of a Resonant Excitation Effect”
 Tatsuya Shoji, Yoshihiko Mizumoto, Hajime Ishihara, Noboru Kitamura, Mai Takase, Kei Murakoshi and Yasuyuki Tsuboi
Jpn. J. Appl. Phys. Vol. 51, No. 9 (2012) 092001.

4. “Reversible Photoinduced–Formation and Manipulation of a Two–dimensional Closely Packed Assembly of Polystyrene Nanospheres on a Metallic Nanostructure”
 Tatsuya Shoji, Noboru Kitamura, Fumika Nagasawa, Kei Murakoshi, Hajime Ishihara, and Yasuyuki Tsuboi
J. Phys. Chem. C Vol. 117, No. 6 (2013), pp 2500–2506.

5. “Resonant Excitation Effect on Optical Trapping of Myoglobin: The Important Role of a Heme Cofactor”
 Tatsuya Shoji, Noboru Kitamura, and Yasuyuki Tsuboi*
J. Phys. Chem. C Vol. 117, No. 20 (2013), pp. 10691–10697

6. “Permanent Fixing or Reversible Trapping and Release of DNA Micropatterns on a Gold Nanostructure Using Continuous–Wave or Femtosecond–Pulsed Near–Infrared Laser Light”
 Tatsuya Shoji, Junko Saito, Noboru Kitamura, Fumika Nagasawa, Kei Murakoshi, and Yasuyuki Tsuboi*
J. Am. Chem. Soc. Vol. 135, No. 17 (2013) 135, pp. 6643–6648.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件(出願準備中)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・国際会議招待講演10件、国内招待講演 約20件
- ・これらの一連の成果は国際光工学会(SPIE)から3月にニュースリリースされ、世界的な反響を得ている(SPIE NEWSROOM, March 5, 2013 (DOI: 10.1117/2.1201302.004656))。

研究報告書

「光合成で駆動する新しい生物代謝」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 永島 賢治

1. 研究のねらい

光合成におけるエネルギー変換過程は、光化学反応中心と呼ばれる膜タンパク質複合体に結合したクロロフィルの特殊な二量体によって駆動されている。この二量体は基本的に強力な酸化剤としての性質を持つ一方、光を受けて励起されると一転して非常に低い酸化還元電位をあらわし、強力な還元剤として働く。すなわち、光励起されたクロロフィル二量体が放出する電子が、同じタンパク内に配置されたフェオフィチンやキノンへ次々と渡っていく一方、基底状態へ戻ったこの二量体の正孔は、特定の電子供与体から速やかに電子を受け取り埋められる。この繰り返しによって、クロロフィル二量体がいわば電子を汲み上げるポンプとしての役割を果たし、光合成電子伝達についてはプロトン濃度勾配の形成およびATP/NADHの合成系を駆動する。クロロフィル二量体の正孔を埋める電子供与体には生物進化を反映して多様性が有り、それに伴って光合成電子伝達の経路にもいくつかのパターンがあるが、電子が酸化還元電位の低いものから高いものへと流れていく点では共通している。本研究が目指すことは、クロロフィル二量体の酸化・還元につながる電子伝達タンパクを遺伝子操作で改変し、経路の人為的変更を通じて光エネルギーを本来とは異なる代謝系で利用するための技術を確立することである。

本研究で使用する紅色細菌(プロテオバクテリア)における主要な光合成電子伝達経路は循環的であることが知られている。この経路は光化学反応中心複合体、キノンプール、チトクロム*bcl*複合体、水溶性電子伝達タンパクの4つの要素から成り立っている。しかし、理論的には途中で様々な電子の出入りが可能であり、それは水溶性電子伝達タンパクもしくはキノンプールを介して起こり得る。紅色細菌は光合成以外にも酸素呼吸、イオウ化合物の酸化、脱窒(硝酸呼吸)などエネルギー代謝が多様であり、生育環境に応じて光合成電子伝達系と巧みにリンクさせることで複雑な電子伝達網を進化させてきたと考えられる。本研究では、この進化の過程を部分的に取り込んだ遺伝子操作を行い、光合成電子伝達経路の改変を試みる。近年飛躍的に増加しているゲノム情報も活用し、光エネルギーを物質生産や環境浄化に利用するためのブレークスルーを見いだす。

2. 研究成果

(1) 概要

紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* のゲノム DNA の全塩基配列を決定し解析したところ、光合成関連遺伝子はもちろん、水素の酸化・還元や窒素酸化物の還元に関与する酵素遺伝子も見いだされた。水素の酸化($H_2 \rightarrow 2H^+$)に関与する酵素は Hup (uptake hydrogenase) と呼ばれ、この酵素をコードする遺伝子を除去した変異株を作成したところ、光合成培養により水素ガスの顕著な発生がみられた。亜硝酸を一酸化窒素へ還元する酵素 (Nir) の電子供与体が、光合成の反応中心複合体への電子供与体としても働くことも、一連の遺伝子欠損株作成を通じて

明らかになった。これらのことは光合成の電子伝達経路が、他のエネルギー代謝の電子伝達経路とリンクし得ることと、遺伝子操作を通じて電子伝達ネットワークのバランスを改変できる事を示している。一方で、光合成関連遺伝子を他の光合成細菌のものと比較し、分子系統解析を行ったところ、*R. gelatinosus* の光合成器官は進化の過程で遺伝子の種間水平移動により獲得されたことが示された。この進化過程を実験により再現することは、生物の光合成の利用技術の確立に繋がると考えられる。そこで、*R. gelatinosus* の光化学反応中心複合体の L、M、チトクロムサブユニットをコードする遺伝子 (*pufLMC*) を除去し、代わりに他の 7 種の紅色光合成細菌の *pufLMC* 遺伝子をそれぞれ導入した変異株シリーズを作成した。うち 3 つの変異株は光合成による生育能が復活し、進化の過程で起こったと考えられる光合成遺伝子の水平移動が実験室レベルで再現した。これら光合成機能の回復をもたらした *pufLMC* 遺伝子は、受容株である *R. gelatinosus* オリジナルのものと比較したとき、L サブユニットのアミノ酸配列で80%以上、M サブユニットでは70%程度以上の相同性があった。これらの値は光合成器官の交換や導入を成功させる目安になると思われる。

(2) 詳細

研究テーマ A「光合成細菌の電子伝達経路改変」

1. 光合成細菌のゲノム情報解読

遺伝子操作による電子伝達経路の改変を遂行するに当たっては、対象とする生物材料の全遺伝子情報が必須である[著書1]。さきがけ研究開始前から(独)製品評価技術基盤機構とともに着手していた紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* の全ゲノム DNA 塩基配列の決定作業を完了し、さきがけ研究に引き継いで、遺伝子情報解読も完了させた。塩基長は 5,043,253、遺伝子数は 4,706 で、細菌としてはやや大きなゲノムであった。水素発生に寄与するニトロゲナーゼ遺伝子群や、これに拮抗する Uptake ヒドロゲナーゼ遺伝子群の存在が確認された。末端酸化酵素は *aa₃*、*cbb₃*、*bd* の3つのタイプが確認されるなど、電子伝達経路の冗長性が示唆された。[論文4]

2. 光化学反応中心への電子供与体欠落の影響を評価

紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* の光合成反応中心複合体は、光酸化されたバクテリオクロロフィル二量体を素早く再還元する4ヘム型のチトクロムサブユニットを含んでいる。この4ヘムチトクロムと、さらにこのチトクロムを還元する水溶性の高電位鉄-硫黄タンパク (HiPIP) や、水溶性チトクロム *c₈* を欠損した多重変異株を作成したところ、光合成生育速度は野生株より顕著に遅くなったものの、他の電子供与体によりバクテリオクロロフィル二量体が直接再還元されることが閃光照射時間分解分光測定により示された。その再還元速度は $t_{1/2}=3\sim6$ ミリ秒であり、野生株での再還元速度より10倍以上遅いものの複合体内のキノンからの逆反応(電荷再結合)よりは3~4倍速いため、光合成電子伝達が維持されたものと考えられた。このことは、バクテリオクロロフィル二量体を $t_{1/2}=10$ ミリ秒前後以下で再還元することができれば、本来光合成以外で働く様々な電子伝達タンパクを供与体として使用できることを示唆する。[論文2]

3. 光合成と亜硝酸酸化の電子伝達経路のリンク形成

紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* の光合成反応中心複合体への水溶性電子供与体は、

HiPIP、2種類のチトクロム c_8 、チトクロム c_4 の4つが知られている。これらすべてを欠落した4重欠損株は光合成生育速度が著しく低いが、継代培養の過程で野生株並の生育速度まで回復した株が出現した。この回復株では亜硝酸を還元($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$)する酵素群の発現量が異常に高くなっており、この酵素群に含まれる NirM と呼ばれる水溶性チトクロム c が光合成反応中心への電子供与体としても働いていることが閃光照射時間分解分光測定により示された。この回復株を光照射下で培養し亜硝酸を加えたところ、野生株に比して約5倍の還元速度を示したことから、NirM を接点として光合成と亜硝酸還元電子伝達のリンクが可能であることが示された[論文1]。ゲノム中には $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ 、 $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$ の反応を触媒する酵素の遺伝子も見られることから、光による窒素酸化物の還元を活用できる可能性がある。

4. 光合成による水素発生

ニトロゲナーゼによる窒素固定反応($\text{N}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3$)には水素イオンの還元($2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2$)が副反応として伴うことが知られている。紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* のゲノム中にもニトロゲナーゼの遺伝子群が見られたことから、これを利用した光合成による水素発生を試みた。ゲノム中には拮抗反応($\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$)を触媒する uptake ヒドロゲナーゼの遺伝子も見つかったので、この遺伝子を欠落させた変異株 (ΔhupSL) を作成して実験に用いた。通常の培養で用いる天然培地では有意な水素発生は見られなかったが、アスパラギン酸を唯一の窒素源とする合成培地で光合成培養したところ、増殖静止期以降に顕著な水素発生が認められ、30 mL の培養液から1週間で30 mL を記録した。これは、光合成による過剰な還元力が逆電子流(Reverse Electron Flow)を通じて NADH の蓄積につながり、さらにこの NADH がニトロゲナーゼの基質として使われたためと考えられた。[著書3, 4]

研究テーマB「光合成反応中心複合体の種間入れ替えと機能改変」

1. ゲノム解析に基づく光合成の進化の過程

ゲノム情報が公開されている紅色細菌を対象に、光合成関連遺伝子産物のアミノ酸配列の比較と分子系統解析により、*R. gelatinosus* を含む一部の紅色細菌の光合成機能は、その祖先種が、進化の過程で光合成をする種から遺伝子水平移動によって獲得したことが改めて示された[論文4, 5, 著書2]。この進化過程を実験により再現する試みを続けることにより、光合成タンパクの種間交換や非光合成生物への光合成機能の付与が可能になると考えられた。

2. 光化学反応中心複合体遺伝子の種間交換

紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* の光化学反応中心複合体の L、M およびチトクロムサブユニットをコードする遺伝子 (*pufL*, *pufM*, *pufC*) を除去した欠損株(光合成生育不可)に対し、系統的に遠・近とり混ぜた7種の紅色光合成細菌 *Phaeospirillum molischianum*, *Acidiphilium rubrum*, *Blastochloris viridis*, *Rhodospseudomonas palustris*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Roseateles depolymerans*, *Allochrochromatium vinosum* の相同遺伝子 (*pufLMC*) をそれぞれ導入したところ、少なくともこのうちの3種、*P. molischianum*, *R. depolymerans*, *A. vinosum* の遺伝子導入により光合成による生育能が回復した。このことは光合成遺伝子の種間水平移動という進化過程を人工的に再現できたことを示す。ただし、これら反応中心入れ替え変異株の光合成生育速度は親株に比較すると最大10倍程度遅かったため、その原

因を明らかにすべく生菌を用いた閃光照射時間分解分光測定を行った。親株では閃光照射により光酸化した反応中心が、主に 1 ミリ秒以下の速い反応で再還元されたが、3つの変異株のうち特に生育速度の遅い2株では 5~10 ミリ秒の遅い再還元として観察された。この再還元速度は、上記 A-2 で示唆された電荷再結合の速度より若干早いため、光合成電子伝達が辛うじて維持されたものと思われる。

3. 紅色光合成細菌の反応中心複合体への水分解機構の導入

葉緑体やシアノバクテリアの光化学系 2 では、光エネルギーによって水を酸化して電子を獲得する。この反応に関与するルーメン側のペプチド部位6カ所を、紅色光合成細菌の反応中心複合体の対応部位に、交換・導入した変異株シリーズを作成した。これら変異株に酸素発生能は認められなかったが、分光測定では変異反応中心が合成されていることが示唆された。光化学系 2 の D1 サブユニット C 末端領域を導入した株では、遅いながらも光合成による生育が可能であった。

3. 今後の展開

- ・研究成果 B-2 を発展させ、近縁な非光合成細菌に光合成遺伝子クラスターを導入し、バクテリオクロフィル *a* と反応中心複合体の合成系を確立し、かつ機能させることを目指す。具体的には、紅色光合成細菌 *R. gelatinosus* を供与菌、これと近縁で水素代謝能を持つ *Ralstonia eutropha* を受容菌として使用することを計画している。光合成遺伝子クラスターは約 40 kb と規模が大きいため、これを約 20 kb の二つに分け、それぞれを *R. eutropha* の常時発現する遺伝子のすぐ下流に繋げる形で導入するなど、確実な発現に向け工夫する。
- ・やはり研究成果 B-2 で確立した実験系を活用し、特殊な環境下で生育する難培養性の光合成細菌や、環境サンプル中で DNA としてだけ存在が認められる光合成細菌など、希少で研究対象となりにくい光化学反応中心複合体を大量に合成させ、機能と構造の解析に供する。これら特殊な環境条件でのみ増殖するような生物のタンパクからは、強酸・強アルカリ、高熱、高塩濃度などに適応した機能・構造の特徴が見いだされる可能性があり、工業的な光合成の利用を目指すときに有用な情報となり得る。
- ・研究成果 A-4 のさらなる発展として、ニトロゲナーゼに還元力を供給する NADH を過剰に蓄積させることで水素発生能を引き上げる変異を付加することを試みる。NADH 消費の主要な反応は炭酸固定反応と考えられるので、その初期反応を触媒する RubisCO の酵素遺伝子欠損変異株の作成を皮切りに、研究成果 A-1 のゲノム情報を利用して多重欠損変異株を作成し、水素発生の増大を目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

紅色光合成細菌の種間で実際に反応中心遺伝子の入れ替えを試み、70%程度以上のアミノ酸配列相同性があれば、異種反応中心複合体による光合成生育が可能であることを示せたことが、本研究で最大の収穫であった。これまで、同属の極めて近縁な種間でのみ成功例があった反応中心タンパクの入れ替え実験が、思いのほか遠縁なものまで可能であることを示せた事は画期的であった。非光合成生物に光合成機能を導入するという最終目標へ至る

道筋は付けられたと思う。進化の過程を実験によって辿るというアプローチの仕方が功を奏したと言えるのではないだろうか。さらに、今回確立した反応中心入れ替えのシステムは、特殊な環境に生息する研究困難な種の光合成を研究する強力な手段にもなるという、思わぬ活用法も見いだされた。一方で、既存の光合成細菌のエネルギー代謝ネットワークを遺伝子操作によって改変するという、研究タイトルの「新しい生物代謝」に象徴されているテーマに関しては、光合成と水素発生または光合成と亜硝酸酸化のリンク形成を可視化するという形で一定の成果を見たが、結局は拮抗反応の破壊という従来のアプローチに留まってしまったことはやや悔いが残るところである。本来目指したのは酵素タンパクの立体構造情報に基づいて機能を計画的に調整することにあつたが、そのための労力の大部分は光化学系 2 反応中心の水の酸化機能を紅色細菌の反応中心へ付与することを目指す作業に費やしてしまった。こちらは結局、マンガンクラスターの再構成や酸素の発生という画期的成果に結びつかなかった。ただし、変異をペプチド単位でダイナミックに導入した反応中心タンパクの合成自体は実現できたと思われるので、今後の微調整によっては一転して成果につながる可能性を残したことは救いであろう。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

永島賢治博士は、紅色光合成細菌 *Rubrivivax gelatinosus* の全ゲノム解析をはじめとする自身による先端研究の実績を基礎に、進化の過程を部分的に取り込んだ遺伝子操作により、光合成電子伝達経路の改変に挑戦し光エネルギーを物質生産や環境浄化に利用するためのブレークスルーを見いだそうという意欲的な研究提案を行い採択された。

さがけ研究開始後も紅色光合成細菌の全ゲノム解析を継続し遺伝子情報解読を完了させている。全ゲノム解析の結果、ニトロゲナーゼの遺伝子群や拮抗反応を触媒する uptake ヒドロゲナーゼの遺伝子に注目し遺伝子操作技術を駆使することにより変異株を作成して高効率の水素発生に成功している。

粘り強い研究努力の結果、特筆すべきは、光合成遺伝子の種間水平移動という進化過程を実験により再現することに成功したことであろう。紅色光合成細菌の種間で実際に反応中心遺伝子の入れ替えを試み、70%程度以上のアミノ酸配列相同性があれば、異種反応中心複合体による光合成生育が可能であることを示した。これは光合成遺伝子の種間水平移動という進化過程を人工的に再現できたことを意味しており、極めてインパクトの大きい研究成果と考えられる。非光合成生物に光合成機能を導入する明確な足掛かりが得られたと評価できる。実際に、葉緑体やシアノバクテリアの光化学系2のペプチド部位を、紅色光合成細菌の反応中心複合体の対応部位に、交換・導入した変異株シリーズを作成するなど意欲的な研究展開を行っている。これまでの研究成果を基礎に今後いっそうの展開が大いに期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

| |
|--|
| 1. Nagashima S, Shimada K, Verméglio A, Nagashima KVP (2011) The cytochrome c_8 involved in the nitrite reduction pathway acts also as electron donor to the photosynthetic reaction center in <i>Rubrivivax gelatinosus</i> . <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 1807 , 189–196 |
| 2. Verméglio A, Nagashima S, Alric J, Arnoux P and Nagashima KVP (2012) Photo-induced electron transfer in intact cells of <i>Rubrivivax gelatinosus</i> mutants deleted in the RC-bound tetraheme cytochrome: Insight into evolution of photosynthetic electron transport. <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 1817 , 689–96 |
| 3. Kondo M, Iida K, Dewa T, Tanaka H, Ogawa T, Nagashima S, Nagashima KVP, Shimada K, Hashimoto H, Gardiner AT, Cogdell RJ and Nango M (2012) Photocurrent and electronic activities of oriented-His-tagged photosynthetic light-harvesting/reaction center core complexes assembled onto a gold electrode. <i>Biomacromolecules</i> 13 , 432–438 |
| 4. Nagashima S, Kamimura A, Shimizu T, Nakamura S, Aono E, Sakamoto K, Natsuko Ichikawa N, Nakazawa H, Sekine M, Yamazaki S, Fujita N, Shimada K, Hanada S and Nagashima KVP (2012) Complete genome sequence of phototrophic beta-proteobacterium <i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144. <i>J. Bacteriol.</i> 194 , 3541–3542 |
| 5. Okubo T, et al. (2012) Complete genome sequence of <i>Bradyrhizobium</i> sp. S23321: Insights into symbiosis evolution in soil oligotrophs. <i>Microbes Environ.</i> 27 , 306–315 |

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

著書

1. 永島賢治 (2011) 環境ゲノム DNA から新しい生物機能を探る. 化学 66, No6 pp74–75
2. Nagashima S and Nagashima, KVP (2013) Comparison of photosynthesis gene clusters retrieved from total genome sequences of purple bacteria. In Beatty TJ (Ed.), *Genome Evolution of Photosynthetic Bacteria*, pp151–178, Academic Press, Elsevier Inc.
3. 永島賢治 (2012 予定) 13 章 細菌型光合成の電子伝達系. 編集 南後守、伊藤繁、杉浦美羽「光合成の物質変換 人工光合成を目指して(仮題)」化学同人
4. 永島賢治、櫻井英博、井上和仁 (2014 予定) 紅色光合成細菌による水素発生.(三宅淳、佐々木健 監修)光合成のエネルギー利用と環境応用 シーエムシー出版 印刷中

研究報告書

「光エネルギー変換過程における固/液界面構造のその場計測」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 野口 秀典

1. 研究のねらい

光エネルギー変換プロセスの理解には規定された構造をもった固体表面で反応を行い、表面の構造や電子状態さらに吸着分子の構造や配向を反応が実際に起こっている溶液中で、高い空間(原子・分子レベル)・時間分解能で決定・追跡する必要がある。特に界面電子構造および電荷移動ダイナミクスに関する知見は、光エネルギー変換プロセスの高効率化に向けた設計指針を与える有用な情報となる。超高真空(UHV)中での界面の電子構造の決定は、XPS や UPS 等により決定可能だが、固/液界面では溶液の存在により UHV で使用されている手法は適用できない。そのため固/液界面の界面電子構造の決定は大幅に遅れているのが現状である。光を用いる分光法は透明な溶液層を透過して表面・界面に到達し、放出されるので固/液界面のプローブ手法として扱いが非常に容易である。事実、赤外反射吸収分光法(IRRAS)やラマン分光法といった電極表面吸着種の振動スペクトルを得る試みは早くから行われてきた。近年では、二次の非線形光学分光法を応用した表面・界面選択的な分光法の適用も活発になってきた。今後、光エネルギー変換プロセスを厳密に理解するには、規定された構造をもった固体表面で反応を行い、表面の構造や電子状態さらに吸着分子の構造や配向を反応が実際に起こっている溶液中で決定・追跡する必要がある。光エネルギー変換過程の多くは、固体と溶液の界面で起こっている。このような固/液界面反応の詳細を理解するためには、界面の電子状態さらに吸着分子の構造や配向を、原子・分子スケールの分解能で、しかも反応が実際に起こっている溶液中「その場」で知り、さらにそれらが反応にともなうどう変化するかを時間的に追跡する必要がある。特に界面電子構造および電荷移動ダイナミクスに関する知見は、光エネルギー変換プロセスの高効率化に向けた設計指針を与える有用な情報となる。本研究では、界面選択的な時間分解振動分光法(フェムト秒赤外過渡吸収分光法、和周波発生分光法)、および新規固/液界面評価システムを構築し、固/液界面における光エネルギー変換プロセスを界面構造(電子・分子)という観点から詳細に議論、光エネルギー変換プロセスにおける真の界面構造を明らかにすることを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

光エネルギー変換過程の多くは、固体と溶液の界面で起こっている。このような固/液界面反応の詳細を理解するためには、界面の電子状態さらに吸着分子の構造や配向を、原子・分子スケールの分解能で、しかも反応が実際に起こっている溶液中「その場」で知り、さらにそれらが反応にともなうどう変化するかを時間的に追跡する必要がある。特に界面電子構造および電荷移動ダイナミクスに関する知見は、光エネルギー変換プロセスの高効率化に向けた設計指針を与える有用な情報となる。本研究では、界面敏感な二次の非線形光学分光法をベースとした新規高感度固/液界面計測システムを構築し、光エネルギー変換プロセス(光触媒、

光電気化学)へ適用し、反応が起こっている溶液中で界面電子構造、分子構造の追跡・決定・評価を行う。さらに、超高速分光法とも組み合わせ、界面電子移動過程の追跡等、界面構造のダイナミクスに関する新たな知見を得ることを目指す。表面・界面構造を詳細に議論していくことで、光エネルギー変換プロセス(特に固/液界面で)の真の姿を明らかにしていく。

(2) 詳細

研究テーマ A 「超高速赤外振動分光法による増感色素の光励起初期過程の追跡」

色素増感型太陽電池(DSSC)は新しい、低コストの太陽電池として注目され、近年のエネルギー問題も背景にあり、現在盛んに研究が行われている。現在、色素増感太陽電池の色素として、ルテニウム錯体が多用されている。この錯体は、可視部に強い金属配位子電荷移動(MLCT)吸収帯を持ち、かつ光励起により長寿命の三重項励起状態を生成する。また、三重項励起状態の量子収率が1であることから、これの最低励起一重項状態からの項間交差速度がきわめて速いことはよく知られている。このためルテニウム錯体を用いたDSSCでは、二酸化チタン(TiO_2)への電子注入は、励起一重項状態からではなく励起三重項状態から起こるといわれている。そこで本研究では、そこで本研究では、フェムト秒の時間分解能を有する、可視・紫外光ポンプ-赤外光プローブ時間分解過渡吸収分光システムを用い、光励起直後の TiO_2 への電子注入過程および、吸着色素(N719)(図1)の構造ダイナミクスを明らかにし、光エネルギーの緩和プロセスについて議論する。図2に540 nmでアセトニトリル溶液中のN719を励起し、色素のNCSの伸縮振動領域の過渡吸収スペクトルを示す。540 nm励起により、 2103 cm^{-1} の吸収の減少(基底状態のポピュレーションの減少)および、 2030 cm^{-1} と 2070 cm^{-1} に新たな吸収が観測された。励起直後に非常に速いスペクトルの変化が1 ps以内に完了し、その後今回測定した50 psの範囲内では、スペクトルの形状は一定であった。最低励起一重項状態からの項間交差速度がきわめて速いことを考慮すると、今回観測された1 ps以内に完了するスペクトルの変化は、三重項励起状態から三重項基底状態への緩和に伴う色素の構造変化を追跡したものであり、三重項基底状態には二種類のNSC状態が存在することを示唆する結果であると考えている。また、アセトニトリル溶液中で TiO_2 基板上に吸着した

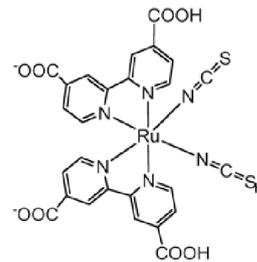


図1 N719の分子構造

そこで本研究では、そこで本研究では、フェムト秒の時間分解能を有する、可視・紫外光ポンプ-赤外光プローブ時間分解過渡吸収分光システムを用い、光励起直後の TiO_2 への電子注入過程および、吸着色素(N719)(図1)の構造ダイナミクスを明らかにし、光エネルギーの緩和プロセスについて議論する。図2に540 nmでアセトニトリル溶液中のN719を励起し、色素のNCSの伸縮振動領域の過渡吸収スペクトルを示す。540 nm励起により、 2103 cm^{-1} の吸収の減少(基底状態のポピュレーションの減少)および、 2030 cm^{-1} と 2070 cm^{-1} に新たな吸収が観測された。励起直後に非常に速いスペクトルの変化が1 ps以内に完了し、その後今回測定した50 psの範囲内では、スペクトルの形状は一定であった。最低励起一重項状態からの項間交差速度がきわめて速いことを考慮すると、今回観測された1 ps以内に完了するスペクトルの変化は、三重項励起状態から三重項基底状態への緩和に伴う色素の構造変化を追跡したものであり、三重項基底状態には二種類のNSC状態が存在することを示唆する結果であると考えている。また、アセトニトリル溶液中で TiO_2 基板上に吸着した

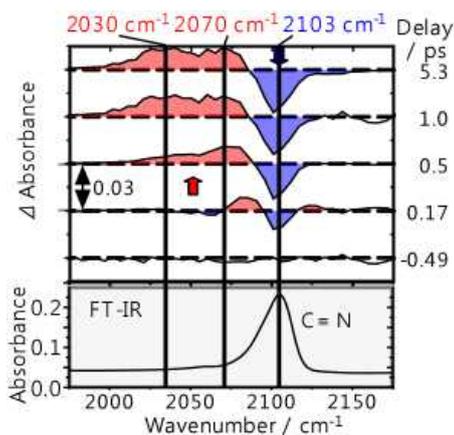


図1 540 nm励起後のN719色素のNSC伸縮振動領域のスペクトル変化

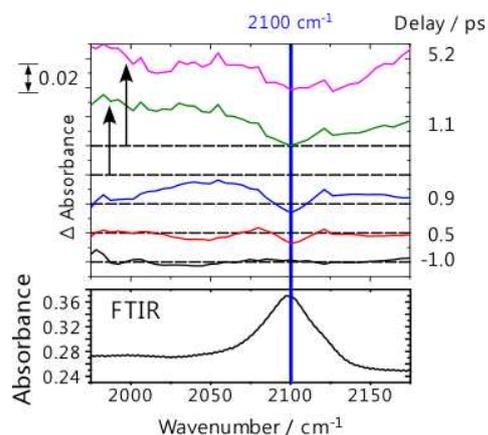


図3 540 nm励起後の TiO_2 基板上に吸着したN719色素のNSC伸縮振動領域のスペクトル変化

N719色素を540 nmで励起後の色素のNCS伸縮振動領域の過渡吸収スペクトルを図3に示す。溶液中のN719と同様、励起直後の極めて短い時間領域(1 ps以内)で 2103 cm^{-1} の吸収の減少および、 2030 cm^{-1} と 2070 cm^{-1} に新たな吸収が観測されたが、その後(1 ps~)励起色

素から基板であるTiO₂の伝導帯への電子注入に伴う励起電子の吸収が全体のバックグラウンドの増加として観測された。以上、本研究によってN719からTiO₂への電子注入過程は三重項基底状態を介して起っていることを振動分光学的に明らかにすることができた。

研究テーマB「光誘起表面キャリアダイナミクスの追跡」

光触媒反応を考える上で、触媒表面に関する情報は極めて重要である。触媒表面に到達した光励起キャリアのみが、実際の光触媒反応に寄与するからである。本研究では光励起キャリアの動的挙動の追跡に加え、触媒表面での反応を分子レベルで明らかにしていくことを目指す。界面選択的な振動分光法であるSFG分光法を光触媒表面に適用することで、表面反応を分子レベルで明らかにすることが出来ると考えている。

光触媒は助触媒として、主に水素発生反応を促進させるために金属を光触媒表面に担持するケースが多々ある。本研究では、この助触媒金属上にプローブ分子としてCO(一酸化炭素)を吸着させ、光励起後、助触媒表面に到達する電子の到達速度を、吸着COの振動波数の時間変化として追跡することで、光触媒表面のキャリアダイナミクスを追跡し、反応活性、反応機構と合わせて議論することを考えている。可視光応答光触媒のひとつであるLaMg_{1/3}Ta_{2/3}O₂N上に担持されたRh金属微粒子上に吸着したCOの検出及び定常的な光応答を試みた。測定には、半円筒型のSiプリズム(d=25mm)上にAu薄膜を無電解めっき(膜厚数10nm)してSEIRAS基板を作製したの

ち、Rh担持LaMg_{1/3}Ta_{2/3}O₂N 1mgを含む懸濁液をAu薄膜上の~φ15mmの範囲に滴下、乾燥させた試料を使用した。プリズムを赤外分光用セルにセットしたのち、セル内部を純水で満たす。COガスを30分間通気することで、Rh上にCOを吸着させ、吸着後Arを通気して水中のCOを除去し、照射の有無で赤外分光測定を行った(図4)。励起光源としてXeランプ(>420nm)を使用した。定常照射前後での赤外吸収スペクトルの測定を行った。その結果得られた差スペクトルを図5に示す。2038cm⁻¹に上向きのピークと2050cm⁻¹に下向きのピークが明確に観測された。このことから、照射により、吸着COの振動波数が低波数側へシフトしたことが分かる。低波数側のスペクトルのシフトは、光励起によって生成した電子が、触媒表面に到達し、助触媒のRhのdバンドへ電子を注入し、注入された電子がCOの2π*反結合性軌道へ逆供与されることで、C-O結合次数が低下し振動の低波数シフトが観察されると説明することが出来る。図6に540nmの可視光励起後の吸着CO伸縮振動領域の過渡赤外スペクトルを示す。2049cm⁻¹付近にブロードな下向きのピークが観測されており、光励起により、Rh上に励起電子が移動したことによって、基底状態のCO伸縮振動のピーク波数が低波数側にシフトしたことを示している。時間が経過するにつれ下向きのピークは次第に消失しており、Rh上の電子が再結合等により失活していく様子が分かる。COのピーク波数(2049cm⁻¹)と振動と関連のない2124cm⁻¹とのAbsorbanceの差の時間変化を図7に示す。その結果、Rh上に移動してきた励起電子の寿命は約50psであることが分かった。Rh担持LaMg_{1/3}Ta_{2/3}O₂N触媒は可視光で水を分解可能な触媒であるが、反応効率が非常に低いことが分かっている。今回の測定結果から励起電子の表面での寿命の短さが低活性の要因の一つであると考えられる。以上、本研究では光触媒反応に直接的に関与すると思われる触媒表面の励起電子の寿命を決

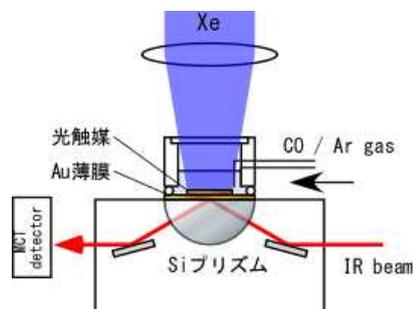


図4 赤外分光用セル

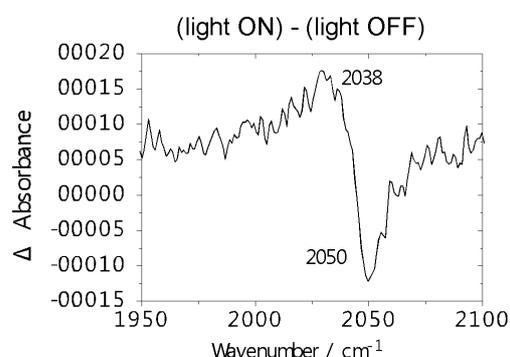


図5 光照射前後の吸着COの差スペクトル

定する手法を提案した。今後種々の光触媒へ適用し触媒活性と表面光励起キャリアの挙動を明らかにしていく。

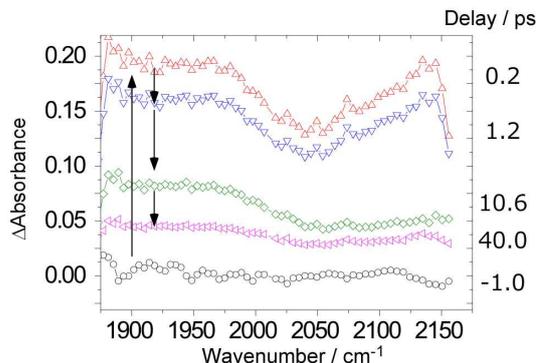


図6 Rh上に吸着したCOの可視光励起後の過渡赤外吸収スペクトル

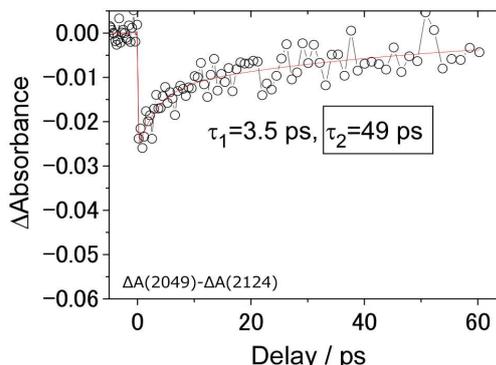


図7 2049 cm⁻¹と2124 cm⁻¹の吸収強度の差の時間変化プロファイル

研究テーマC「新規固/液界面構造評価システムの構築」

固体と溶液の界面では結晶成長、腐食、電析、電極反応などの種々の興味深い過程が起こっている。このような過程の詳細を理解するためには、界面の構造や電子状態さらに吸着分子の構造や配向を、原子・分子スケールの分解能で、しかも反応が実際に起こっている溶液中その場で知り、さらにそれらが反応にともなってどう変化するかを追跡する必要がある。そこで本研究では、二次的非線形光学分光法を電極/溶液界面へ適用させ、電極反応が起こっている溶液中で界面電子構造、分子構造の決定を二重共鳴 SFG(DR-SFG)分光法(図8)によりその場追跡・決定可能なシステムの構築を行った。従来の振動分光法としてのSFG分光法は、赤外の波長のみを変化させ、界面に存在する分子の振動を励起させ、波長固定の可視光との和周波光を検出することで界面の振動スペクトルを得ていた。一方、二重共鳴SFG分光法では可視光の波長も変化させることで、界面に電子準位が存在したときに可視光のエネルギーがその準位と共鳴し和周波光の増強として観測される。そこで、電気化学条件下で白金電極上に吸着したCO分子のSFGスペクトルを図9に示す。SFG測定に用いる可視光の波長を変化させることで、スペクトルのピーク強度が大きく変化している様子が分かる。用いた可視光の波長に対してSFGスペクトルの積分強度をプロットすると、545 nmでSFG強度が大きく増強されていることが分かる(図10)。このPt-COのSFGスペクトルが増強される可視光のエネルギーは電極電位に対して傾き1の直線関係にあることから(図11)、観測されたSFG増強はフェルミ準位からPt-COの界面で形成される5σの非結合性軌道間のエネルギー準位間との共鳴によるものであると考えられる。今回、DR-SFG分光法を用いることで初めて固/液界面の分子構造と電子状態をその場で観測することを示すことが出来た。今後は、本手法を種々の合

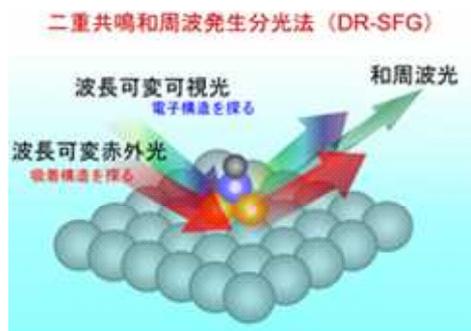


図8 二重共鳴和周波発生分光法

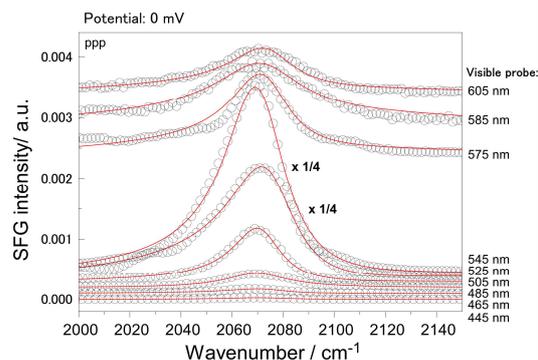


図9 可視プローブ波長を変化させながら測定した白金電極上に吸着したCOのSFGスペクトル

金型電極触媒へ適用し、触媒活性と界面電子構造の関係を明らかにすることが可能となり、新規触媒設計に有用な指針を提供することが可能となる。

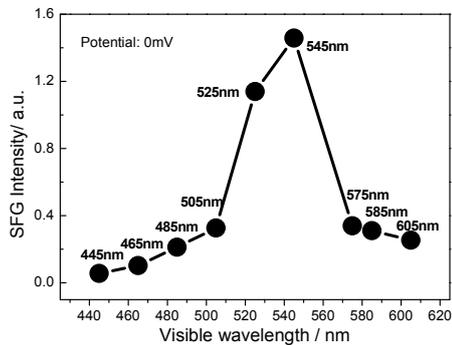


図 10 可視プローブ波長と吸着 CO の SFG ピーク強度の関係

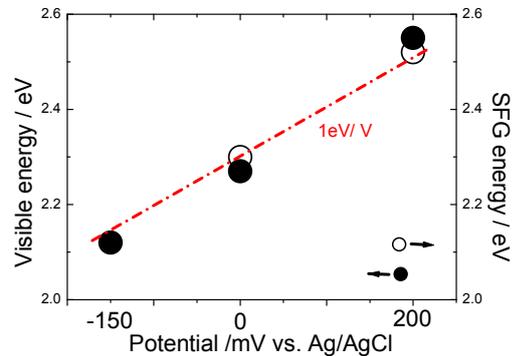


図 11 電極電位と増強ピーク波長との関係

3. 今後の展開

本研究は固／液界面反応の解明を目指して界面敏感な二次的非線形分光法をベースとした新規固／液界面プローブシステムを開発し、光エネルギー変換プロセスに適用しようとするものである。本研究の実施により対象としてとりあげた光触媒反応、光電気化学反応についての基礎的理解が飛躍的に進むことはもちろん、開発された装置を積極的に他の研究者との共同研究に公開することによって、基礎・応用の両面での大きな広がりが期待できる。また、本計測システムは光エネルギー変換プロセスの解明にとどまるものではなく、思いつくだけでも、ポリマー表面の成分分布の分析、分子素子などの固体表面の分子配向の局所分析、金属表面の局部腐食など非常に多様な表面・界面プローブのツールとなり得る、用途があり、装置が開発され、公開されると対象は飛躍的に広がるものと考えられる。今後は、他研究者との共同研究を積極的に進め、引き続き光エネルギー変換プロセスの機構解明に迫りたい。

4. 評価

(1) 自己評価

光エネルギー変換の多くが固体と溶液の界面という反応場で起っている。よって表面・界面計測は反応の素過程、機構を考える上で重要な情報を提供してくれる。たとえば、光触媒反応の活性は、価電子帯および伝導帯の位置関係のみで議論されるケースが多々あるが、実際の反応は触媒表面で進行するため、活性を議論する上で表面・界面の議論は重要である。例えば本研究では、表面反応を振動分光法と時間分解測定法とを組み合わせることでプローブすることを行ってきた。プローブ分子を光触媒表面に吸着させ、その振動スペクトルの時間変化から光励起キャリアの表面での状態をプローブ出来る可能性を示すことが出来た。今後適用例を増やし、表面プローブの新たな手法として利用可能であることを実証する予定である。

また、光エネルギーがどのように表面の化学反応に関与するのかを詳細に議論するためには界面の電子構造と表面反応との関連を明らかにする必要があると考え、新規固／液界面分

光法の開発にも取り組んだ。最初の試みとして白金電極上に吸着した CO を測定対象としたが、二次の非線形分光法をベースとした二重共鳴和周波発生分光法を開発し、CO が吸着することによって界面に新たに形成される準位を固/液界面では初めて観測することに成功した。期間内に表面反応と界面電子構造との関連を明らかにすることは出来なかったが、本分光法により界面電子準位をとらえたことの意義は大きいと考えている。今後の大きな展開が期待される。

研究全体を通してまだ不十分、不明瞭な点が多く残されている。したがって、今後も引き続き光エネルギー変換に関する研究を、他のさがけメンバーとの共同研究を通して遂行していく予定である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

人工光合成を誘起する光化学初期過程の多くは、固体と溶液の界面で進行するが、その反応過程の学理を理解するには、界面の電子状態、吸着分子の構造、配向を原子・分子サイズの空間分解能で、またその反応進行をリアルタイムの超高速時間分解能で観察する必要がある。さらには反応が実際に進行している系、溶媒が大量に共存する「その場」、での観測が望まれる。

野口秀典博士は上記の視点から、自身の超高速非線形分光領域の研究実績を基礎に、主に界面選択的な時間分解振動分光法(フェムト秒赤外過渡吸収分光法、和周波発生分光法)により、固/液界面における光エネルギー変換プロセスの学理を解明する意欲的な研究提案を行い採択された。研究開始から若干の誘導期間が必要ではあったが、現実感のある反応系で超高速のキャリアダイナミクスについて振動分光法を取り入れた信頼度が極めて高い観測に成功している。特に光触媒半導体上に担持された金属クラスターへのキャリア電子到達速度やその滞在時間の実観測は、極めてインパクトの大きい事例として注目される。また、電気化学反応過程についても界面敏感な二次の非線形光学分光法をベースとした新規高感度固/液界面計測システムを構築し、観測に成功している。

研究総括としては、野口博士の卓越した超高速計測技術を武器に、その場測定、実時間測定での人工光合成系に関する共同研究を大いに期待したが、さがけ研究期間内では充分には実現できなかったのが残念である。今後、いっそうの共同研究の推進を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. T. Kondo, K. Nomura, M. Gemmei-Ide, H. Kitano, H. Noguchi, K. Uosaki, Y. Saruwatari "Structure of water at zwitterionic copolymer film-liquid water interfaces as examined by the sum frequency generation method" *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2014, 113, 361-367.
2. H. Noguchi, K. Taneda, H. Naohara, K. Uosaki "Humidity Dependent Structure of Water at

| |
|---|
| the Interfaces Between Perfluorosulfonated Ionomer Thin film and Pt and HOPG Studied by Sum Frequency Generation Spectroscopy” <i>Electrochem. Commun.</i> 2013, 27, 5–8. |
| 3. Sheng-Fu Tong, Hidenori Noguchi, Takuya Masuda, and Kohei Uosaki “Direct Proof of Potential Dependent Oxygen Adsorption on a Gold Electrode Surface by Electrochemical Quartz Crystal Microbalance” <i>Electrochem. Commun.</i> 2013, 34, 33–36. |
| 4. Y. Zhang, H. Noguchi, S. Ye, K. Uosaki, “Structure of adsorbed molecular layer on fused quartz surface determined sequentially in sodium stearate solution, dry Ar, pure water, and dry Ar by sum frequency generation spectroscopy”, <i>Surface Science</i> , 2012, 607, 92–96. |
| 5. T. Kondo, K. Nomura, M. Murou, M. Gemmei-Ide, H. Kitano, H. Noguchi, K. Uosaki, K. Ohno, Y. Saruwatari, “Structure of water in the vicinity of a zwitterionic polymer brush as examined by sum frequency generation method” <i>Colloids and Surfaces B: Biointerfaces</i> , 2012, 100(1), 126–132. |

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

2013/11/26-28 : 野口秀典 : “電極/溶液界面をプローブする非線形分光” 第33回表面科学学術講演会

2013/10/11-13 : 野口秀典, 伊藤未希雄, 魚崎浩平 : “超高速赤外分光法による光触媒表面の光励起キャリアダイナミクスの追跡” 光化学討論会 2013

2013/08/25-30 : H. Noguchi, S. Yang, M. Ito, K. Uosaki : “Utilization of double resonance sum frequency generation (DR-SFG) on CO covered Pt electrode to investigate the interfacial vibrational and electronic structure at solid/liquid interface” 7th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy

2013/06/27 : H. Noguchi, M. Ito, K. Uosaki : “Utilization of ultrafast infrared vibrational spectroscopy to investigate the initial process of photoenergy conversion systems” The 6th GREEN Symposium

2013/05/19-24 : H. Noguchi, M. Ito, K. Uosaki : “Initial interfacial structure and dynamics of dye sensitizer under photoexcitation studied by ultrafast infrared spectroscopy” International conference on TRVS

2013/03/22-25 : 野口秀典 : “表面振動分光法による光エネルギー変換システムの界面構造評価” 日本化学会第93回春季大会

2012/11/20-22 : 野口秀典, 伊藤未希雄, 魚崎浩平 : “超高速赤外振動分光法による増感色素の光励起初期過程の追跡” 第32回表面化学会学術講演会

2012/09/24-28 : H. Noguchi, M. Ito, K. Uosaki : “Initial interfacial structure of dye sensitized titanium dioxide film under photo-excitation studied by ultrafast infrared spectroscopy” 14th International Conference on Vibrations at Surfaces

2012/09/18-21 : 野口秀典, 伊藤未希雄, 魚崎浩平 : “フェムト秒赤外振動分光法による増感色素の光励起初期過程の追跡” 第 6 回分子科学討論会

2012/09/12-14 : 野口秀典, 伊藤未希雄, 魚崎浩平 : “フェムト秒赤外振動分光法による増感色素の光励起初期過程の追跡” 2012 年光化学討論会

2012/03/10-11 : 野口秀典, 伊藤未希雄, 魚崎浩平 : “和周波発生分光法による固／液界面エネルギー変換プロセスの追跡” 第 5 回 SFG 研究会

2012/02/29 – 2012/03/02 : H. Noguchi, K. Uosaki : “Structure of interfacial water structure on (photo) energy conversion systems studied by sum frequency generation (SFG) spectroscopy” MANA international symposium

2012/02/27 : 野口秀典 : “SFG 分光法による電極界面構造評価” 第 3 回 ナノ材料科学環境拠点シンポジウム

2011/12/15-17 : 野口秀典, 伊藤未希雄, 魚崎浩平 : “界面振動分光法による二酸化チタン光触媒表面の水の構造” 第 31 回表面科学学術講演会

研究報告書

「超解像蛍光顕微鏡による珪藻のバイオミネラルゼーションの解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 堀田 純一

1. 研究のねらい

光合成生物は太陽光エネルギーを利用した営みの中で光合成をはじめとする様々な物質変換を行っている。数多くの光合成生物の中で、珪藻は海洋における一次生産者として生態系を支えるとともに、海洋における炭酸ガスの固定の多くを担っており、地球環境の維持においても非常に重要な位置を占めている。さらに、珪藻の持つ特徴的な物質変換能力の一つとして、バイオミネラルゼーションによるナノ構造シリカ被殻形成があげられる。珪藻のバイオミネラルゼーションは、常温常圧で非常に安定な機能性ナノ構造材料を創り出すことを可能とする新しいスタイルのものづくりに応用可能であると期待される。

従来、珪藻等の微生物の生態観察は光学顕微鏡により行われてきた。しかしながら、光学顕微鏡には「回折限界の壁」と呼ばれる光の波長の半分程度すなわちサブマイクロメートル程度に空間分解能の限界があり、微生物の内部構造を詳細に観察するためには、不十分であると言わざると得なかった。近年、ファーフィールド超解像蛍光顕微鏡によりその壁を乗り越えて3次元的にナノメートルの解像度で生物を生きたままの姿で観測することが可能となりつつある。しかしながら、珪藻をはじめとする光合成微生物は光合成色素による高い蛍光バックグラウンドを持つために、超解像蛍光顕微鏡による空間分解能の向上の恩恵を得ることはできなかった。

本研究では、珪藻のように光合成色素による自家蛍光バックグラウンドが高い光合成生物でも使用可能な超解像蛍光顕微鏡の開発を行い、珪藻のシリカ被殻およびその形成に関するタンパク質を遺伝子操作等により蛍光ラベルして超解像蛍光顕微鏡により解析して、そのメカニズムを明らかにするとともに、創製した蛍光シリカ被殻の記録媒体、発光素子等のナノ光デバイスとしての工学的応用、さらには珪藻のバイオミネラルゼーションは太陽光による有用資源精製システムであるという視点に立ち、地球に優しい有用資源等の回収法としての応用もねらった。

2. 研究成果

(1) 概要

超解像蛍光顕微鏡をはじめとする高感度蛍光顕微鏡技術を活用することにより、珪藻のバイオミネラルゼーションを解析するとともに、その応用を目指して研究を行った。「光合成生物用超解像蛍光顕微鏡システムの開発および蛍光色素の探索」として、光合成生物での超解像蛍光顕微鏡測定に適した蛍光プローブの精査を行った。Alexa488 を蛍光色素として用い、珪藻被殻表面に存在するタンパク質を標識して dSTORM 測定を行うことに成功した。蛍光色素の自発的な取り込みを利用して珪藻被殻形成過程のタイムラプスイメージングを行うことに成功した。構造化照明顕微鏡法を用いることにより、生きた珪藻における超解像蛍光顕微鏡

測定を行うことに成功した。「珪藻用融合タンパク質発現ベクターの作成」として、ゲノム配列が公開されている *Thalassiosira pseudonana* の恒常的に発現しているタンパク質のプロモーター及びターミネーター領域を用いるベクターを開発した。「珪藻への高効率遺伝子発現システムの開発」として、従来用いられてきたオワンクラゲ由来の蛍光タンパク質ではなくサンゴ由来の蛍光タンパク質を用いて、より明るく蛍光する形質転換体を得ることができた。「珪藻シリカ被殻を利用した光学素子の開発」として、珪藻被殻の表面のタンパク質または珪藻被殻中に蛍光色素を導入することにより作製した蛍光性珪藻被殻に顕微鏡下でパターンを書き込むことに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A「光合成生物用超解像蛍光顕微鏡システムの開発、および蛍光色素の探索」

珪藻をはじめとする光合成生物は、光合成関連の色素により700nm付近に強い蛍光を持つため、その蛍光とスペクトル的に分離可能な蛍光色素、蛍光タンパク質を使用する必要がある。そこで、超解像蛍光顕微鏡に用いられてきた蛍光色素のみでなく、これまで使われていなかった蛍光プローブ等についても単一分子レベルでのオン・オフ状態を精査するとともに超解像蛍光顕微鏡での利用の可能性を検討

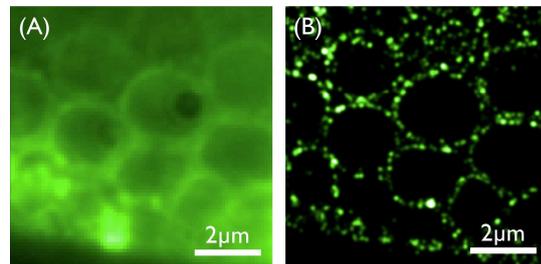


図1 Alexa488 により表面タンパク質を標識した珪藻被殻の(A)蛍光像、(B)dSTORM 像

した。その結果、超解像蛍光顕微鏡で使用可能な蛍光色素として Alexa488, Dronpa, EGFP 等は特に適していることが分かった。珪藻被殻の微細構造の観察を目的として Alexa488-NHSEster により珪藻被殻を標識して、超解像蛍光顕微鏡 (dSTORM) 測定を行った。その結果、珪藻被殻表面のタンパク質を Alexa488 により標識し、珪藻被殻表面の微細構造を図1に示すとおり 20~30nm の空間分解能で観察することができた。

蛍光色素を培地中に含有させて染色を行いながらライブイメージングを行う際は、一般に培地中に存在する蛍光色素からのバックグラウンド蛍光が問題となることが多い。そこで、高コントラストの測定が可能な系を探索するために、日本沿岸から採集した数種の珪藻についてローダミン B およびフルオロセインを珪藻被殻染色のための蛍光色素として用い測定を行った。その結果、ローダミン B を 0.1 μM の濃度で培養液中に添加した場合、比較的大型の *Coscinodiscus*, *Chaetoceros*, *Aulacoseira*

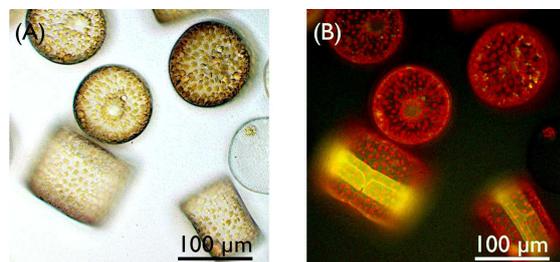


図2 0.1 μM のローダミン B を含有する f/2 培地中の *Coscinodiscus* sp. の (A) 透過像、(B) 蛍光像

について、培養液中の蛍光色素によるバックグラウンドは存在するが、新しく形成された珪藻被殻が相対的に明るく蛍光する様子が観測された。測定結果を図2に示す。また、タイムラプ

スライミングを行い、珪藻の被殻形成過程を可視化することにも成功した。

光合成生物は、光合成を行わない生物と比較して光合成色素の光吸収のために高強度の光に対して光毒性が顕著に現れやすいことが知られている。そこで、従来型の蛍光顕微鏡と同程度の光強度の励起光照射により、2倍程度空間分解能の高い超解像蛍光顕微鏡像の取得が可能となる構造化照明顕微鏡法による測定を行った。ローダミン B を 0.1 μM 添加した培地中で淡水産の珪藻である *Aulacoseira sp.* を培養して被殻を染色しながら測定を

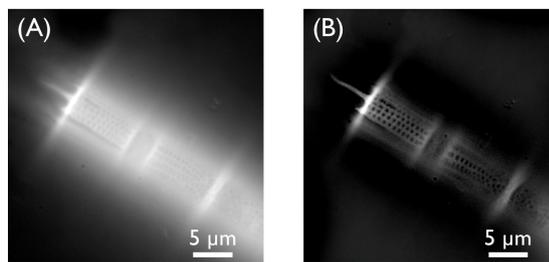


図3 *Aulacoseira sp.* の(A)蛍光像、(B)構造化照明顕微鏡法による超解像蛍光顕微鏡像

行った。図3に、構造化照明顕微鏡法により撮像した *Aulacoseira sp.* の蛍光像を示す。従来型の蛍光像と比べて高解像度・高コントラストの蛍光像を得ることができたことがわかる。

以上の結果から、抽出した珪藻被殻については、dSTORM、生きた珪藻の被殻の測定には構造化照明顕微鏡法が適していることがわかった。

研究テーマ B「珪藻用融合タンパク質発現ベクターの作成」

珪藻における遺伝子組換え系では、発現レベルの高さから光合成に関するタンパク質のプロモーター・ターミネーター領域が使われていたが、本研究では汎用性のあるベクターの開発を目的として他の恒常的に発現するタンパク質のプロモーター・ターミネーター領域の利用について検討した。*Thalassiosira pseudonana* ゲノム上の恒常的に発現するタンパク質のプロモーター領域をクローニングし、それらを元に抗生物質である Nourseothricin の耐性遺伝子を発現させるベクターを構築し形質転換を行ったところ、プロモーター活性を持つことを示唆するデータを得ることができた。

研究テーマ C「珪藻への高効率遺伝子発現システムの開発」

羽状目珪藻 (*Phaeodactylum tricornutum*) を宿主として用い、サンゴ由来の蛍光タンパク質の発現効率について検討した。その結果、形質転換珪藻を得ることに成功するとともに、従来のオワンクラゲ由来の蛍光タンパク質よりもより明るく蛍光させることに成功した。このことにより、超解像蛍光顕微鏡で用いられる Dronpa や KikGR と同様にサンゴ由来の蛍光タンパク質が珪藻内で発現可能であることが確認できた。また、細胞内小器官に局在するいくつかの融合蛍光タンパク質発現のテストを行った結果、蛍光タンパク質を珪藻の核に局在させて発現させることに成功した。

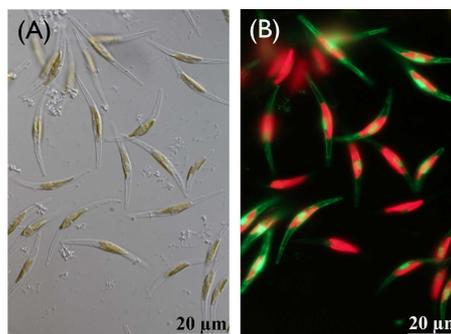


図4 *Phaeodactylum tricornutum* におけるサンゴ由来蛍光タンパク質の発現 (A)透過像、(B)蛍光像

研究テーマD「珪藻シリカ被殻を利用した光学素子の開発」

珪藻におけるバイオミネラリゼーションにより形作られる被殻は、従来のバイオテクノロジーに基づくタンパク質等の物質生産と異なり、長期保存可能なナノ構造を有するマイクロメートルサイズの構造体としての性質を持つ。その応用の第一歩として、珪藻被殻を蛍光色素により染色し、蛍光性珪藻被殻の光情報記録媒体としての可能性について検討した。

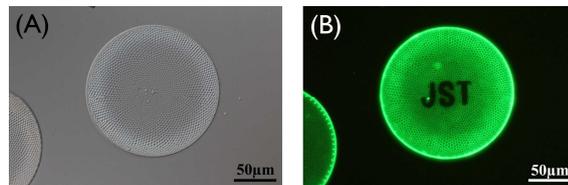


図5 蛍光性珪藻被殻へのパターン記録
(A)透過像、(B)蛍光像

パターン記録システムとして、試料の共役面にパターンマスクを配置し、試料に光パターンを照射するシステムを構築した。抽出した珪藻被殻に Alexa488-NHS ester を用いて作製した蛍光性珪藻被殻、ローダミン B を培地中に 0.1 μM の濃度で含有させて作製した蛍光性珪藻被殻について、それぞれパターン記録を行い任意のパターンを記録することに成功した。

3. 今後の展開

珪藻がバイオミネラリゼーションにより被殻を形成していく過程を高解像度の蛍光像により観察することが可能となり、蛍光性珪藻被殻の応用例として光パターンの記録にも成功した。今後、珪藻被殻形成過程の可視化によって工業的利用に適した珪藻のスクリーニングが期待される。珪藻被殻が培養液中に含有させた蛍光色素によって観察可能であるということは、蛍光色素をはじめとする有機化合物を珪藻被殻に濃縮させて回収可能であることを示している。今後、蛍光色素のみではなくその他の有機化合物、例えば有害化学物質等の回収法、すなわち太陽光エネルギーを利用した環境浄化法として応用できる可能性がある。珪藻において蛍光タンパク質をより明るく発現させて観察することも可能となり、従来よりも高感度・高精度の蛍光顕微鏡測定が可能となることが期待される。しかしながら、さらに高精度・高解像度の珪藻のバイオミネラリゼーションプロセスのバイオナノイメージングによる解析には、さらに洗練された有機蛍光色素や超解像蛍光タンパク質の開発、高効率の遺伝子組換えシステムが必要であるという問題点も明らかとなった。今後、これらの解析を行い珪藻のバイオミネラリゼーションを利用した新しいものづくりの実用化を目指すためには、さらなる研究が必要である。

4. 評価

(1) 自己評価

研究計画立案時のモチベーションは、私が研究者を目指すきっかけとなった珪藻とその被殻形成過程を詳細に光学顕微鏡で観察し、それを応用して世の中の役に立つものづくりを行いたい！ということであった。そのために、光合成生物の観察に適した超解像蛍光顕微鏡技術と蛍光プローブの探索、観察に適した珪藻の探索、珪藻の遺伝子組換え系など多くの技術について研究を展開する必要があった。珪藻のバイオミネラリゼーションを超解像蛍光顕微鏡により解析するという目標に対しては、抽出した珪藻被殻については dSTORM、生きた珪藻については構造化照明顕微鏡法により可視化することができた。また、珪藻被殻の工学的応用

を目指すという目標に対しては、蛍光性珪藻被殻へのパターン記録に成功した。しかしながら、蛍光タンパク質を珪藻被殻にタグしてバイオミネラリゼーション関連タンパク質の動きを解析するとともにバイオテクノロジーに基づく新たなものづくりを提案するという目標に対しては、珪藻の遺伝子組換えが新しいベクターを使って可能になりつつあるとはいえ、現時点でやっと本格的に取りかかり始めることができた段階にあると言わざるを得ない。しかしながら、本研究を行わせて頂いたことにより、本当に非常に多くのことを学ぶことができた。特に研究開始以前の超解像蛍光顕微鏡技術に加えて遺伝子組換え技術を研究の柱として加えることができたので、本研究のテーマをライフワークとしてさらに発展させていきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

地球上の光合成は主に海洋中で行われている。珪藻は海洋における炭酸ガスの固定など一次生産者として重要な役割を果たしている。珪藻はその被殻をバイオミネラリゼーションによるナノ構造シリカで形成している。機能性ナノ構造材料としても興味深い。珪藻が営む光合成とバイオミネラリゼーションは光エネルギーと資源循環の視点からも大変興味深い研究対象と言える。堀田純一博士は、超解像蛍光顕微鏡などに関する自身の着実な研究実績を基礎に、超解像観察の生体試料として珪藻に着目し、自家蛍光の強い生体試料をいかにして超解像観察するについて意欲的な研究提案を行い採択された。珪藻を機能性ナノ構造材料としても着目し新しい記録材料開発への挑戦も提案した。さきがけ研究開始直後にベルギーから日本に異動し、さらに異動後も新しい研究施設への移転など、困難な状況を克服しながら誘導期間を経て、実際に超解像顕微鏡測定装置を立ち上げ、新たに日本沿岸から採集した数種の珪藻について蛍光色素の自発的な取り込みを利用して珪藻被殻形成過程のタイムラプスイメージングを行うことに成功している。構造化照明顕微鏡法を用いることにより、生きた珪藻における超解像蛍光顕微鏡測定を行うことにも成功した。光合成生物用の新しい蛍光タンパク質の開発にも挑戦している。これまでの論文発表状況は必ずしも充分とは言えないが、今後のいっそう集中した研究展開を期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

| |
|--|
| 1. T. Chiba, H. Fujiwara, J. Hotta, S. Takeuchi, K. Sasaki. Experimental evaluation of diffusion constant in a thin polymer film by triplet lifetime analysis of single molecules. <i>Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry</i> . 2012, 238, 24-28 |
|--|

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. J. Hotta, Biomineralization in Diatoms, *Seventh International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments (SNCPP12)*, 2012. 6. 23, Kusatsu, Japan
2. 堀田純一, 超解像蛍光顕微鏡によるバイオナノイメージング, 一珪藻のバイオミネラリゼーションの解析を目指して—第25回つくば藻類・プロテオミクスフォーラム, 2013年2月18日, 筑波大学
3. J. Hotta, High resolution microscopy in biology, diatoms, Remise de la médaille de bronze du CNRS à Michel Sliwa, Scientific Symposium, 2013. 11. 5, Lille, France
4. 堀田純一, 超解像蛍光顕微鏡技術の開拓, フロンティア研究センター講演会, 2013年12月13日, 徳島大学

国際会議

1. J. Hotta, H. Mizuno, P. Dedecker, J. Hofkens, Optical patterning on fluorescently labeled diatom shells, *The 26th International Conference on Photochemistry (ICP 2013)*, 2013. 7. 21–26, Leuven, Belgium
2. J. Hotta, Optical microscopy of diatoms, Post-Conference ICP2013 held in honour of Prof. Dr. Frans C. De Schryver and Prof. Dr. Hiroshi Masuhara, 2013.7.26., Leuven, Belgium

総説・解説

1. 堀田純一, 水野秀昭, センペルス ウーター, ホフケンス ヨハン, 超解像蛍光顕微鏡の最近の進歩, *光化学*, 42(3) (2011).

アウトリーチ活動

1. 堀田純一, 最先端科学で利用される生物の色素の秘密を探る —生命システムの機能を最先端科学に応用する—, サイエンスカフェ@米沢 生き物の色と形, 2012年11月7日, 山形大学

研究報告書

「表面バンドエンジニアリングによる高性能水分解光触媒の創生」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 前田 和彦

1. 研究のねらい

半導体光触媒による水の分解反応は、バンドギャップ以上の光エネルギーを吸収することで光触媒内部に生じた電子と正孔が、再結合せずに光触媒表面に到達し、水を酸化、還元して初めて達成される。したがって、ある光触媒の反応効率は光触媒粒子本体の性質(結晶化度、粒径、吸収特性などの物理化学的特性)に大きく依存する。その一方で、光触媒の表面を独立した構成要素として捉えて研究した例はほとんどない。反応基質である水と接する光触媒粒子の表面近傍は、水の酸化還元反応が起こる反応場であるとともに、光吸収によって光触媒内部で生じた電子と正孔の電荷分離過程に対して重要な役割を担う。したがって、光触媒微粒子の表面近傍を効果的にデザインすることができれば、光触媒活性を飛躍的向上できると期待される。とりわけ、固体表面には格子欠陥が高密度に含まれており、それらが作る表面準位が光触媒活性に悪影響を与えることが経験的に知られている。本研究は、表面欠陥準位密度の低減と表面半導体特性の改質を通じた水分解光触媒の性能向上を目的としている。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、半導体微粒子光触媒表面に存在する格子欠陥の能動的制御により、水の完全分解の光触媒活性を向上させることを目的として研究を展開した。得られた主な成果は次の A～C に集約することができる。

成果 A「 $ZrO_2/TaON$ 光触媒の構造—活性相関の解明と高性能化」

- ・ $ZrO_2/TaON$ 光触媒の水素生成活性向上のための指針を明らかとした
- ・ 最適化した $ZrO_2/TaON$ 光触媒を用いて、一段階励起による可視光水分解を達成した

成果 B「広域可視光の有効利用を目指した欠陥制御型酸窒化物光触媒の開発」

- ・ $BaZrO_3$ との固溶体形成により $BaTaO_2N$ 光触媒中の格子欠陥を低減し、高活性化することに成功した
- ・ $BaTaO_2N$ 及び $BaZrO_3-BaTaO_2N$ 固溶体の未開拓機能、水の光酸化触媒能を見出し、そのバンド端位置を明らかにするとともに、バンドギャップ 2.0 eV 未満の半導体を用いてはじめて、水の酸化還元を広域可視光の照射下で実証した
- ・ d^1 電子状態の W(V)ドーピングが $BaTaO_2N$ による水の光酸化反応に対して例外的に好影響を与えることを見出した

成果 C「ルチル型 TiO_2 光触媒による水の完全分解及び格子欠陥密度—活性相関の解明」

- ・ ルチル型 TiO_2 の特異な表面反応特性に着目し、純水の完全分解反応を達成した
- ・ その光触媒活性が、表面の欠陥密度に強く依存することを明らかとした

以下に、各成果の詳細を説明する。

(2) 詳細

成果 A「ZrO₂/TaON 光触媒の構造—活性相関の解明と高性能化」

本さがけ研究提案のきっかけとなった 2 段階励起型水分解システムの水素生成光触媒として高性能を示す ZrO₂/TaON 光触媒を用いたケーススタディを実行し、光触媒の構造と活性の相関を明らかにすることで、高性能化を図る上での指針を得ることを目指した。5 種の Zr 前駆体を用いて ZrO₂/TaON 光触媒を異なる実験条件で調製し、水素生成活性を調べた。ZrO₂ 修飾の結果としてもたらされる TaON の表面格子欠陥濃度の低減度合いは、発光スペクトル測定によって評価することができ、発光強度と水素生成活性の間には、Zr 前駆体を含めた調製条件によらず、明確な正の相関があることを明らかとした。一連の実験結果から、TaON の表面欠陥濃度を効果的に低減するためには、高分散に担持された状態の ZrO₂ が必須であると結論した(論文リスト 5)。

ZrO₂ 修飾により TaON 光触媒の高活性化が可能であることを見出すよりも以前、すなわち未修飾の TaON を用いていた際には、レドックス剤を用いない水の完全分解反応は達成されていなかった。本研究では、最適化した ZrO₂/TaON をコア/シェル型(RuO_x/Cr₂O₃)ナノ粒子と IrO₂ ナノ粒子で修飾することで、水の完全分解を 400 nm 以上の可視光照射下で達成できることを明らかとした(図 1)。これは、d⁰ 電子状態の酸窒化物光触媒を用いて、可視光で水を水素と酸素に完全分解した世界で最初の例である(論文リスト 2)。

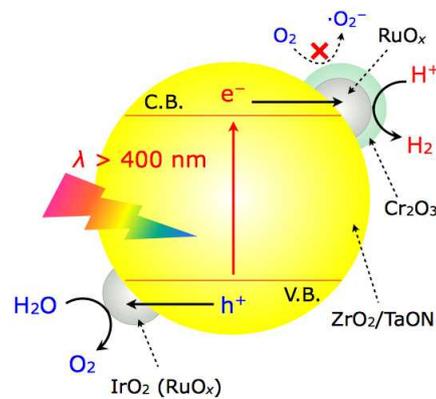


図 1. 修飾型 ZrO₂/TaON を光触媒とした水の可視光完全分解反応

成果 B「広域可視光の有効利用を目指した欠陥制御型酸窒化物光触媒の開発」

ZrO₂/TaON に関する研究で得られた知見を、より幅広い領域の可視光を吸収できる BaTaO₂N (バンドギャップ: 約 1.8 eV) に適用し、高活性化を試みた。Zr(IV)種を用いた複合体の形成(BaZrO₃/BaTaO₂N)を試みたが、得られたものは BaZrO₃ と BaTaO₂N の固溶体であり、ZrO₂/TaON 系に見られたような複合体構造は得られなかった。それでも、未修飾の BaTaO₂N と比べて BaZrO₃-BaTaO₂N 固溶体は、ヨウ化物イオンを電子供与剤とした非犠牲的な可視光水素生成反応に 6~9 倍の高い光触媒活性を示した(*Chem. Eur. J.* 2011, 17, 14731, 図 2)。一連の研究を通じて、BaTaO₂N の合成化学上の問題点である Ta₃N₅ の副生成も解消で

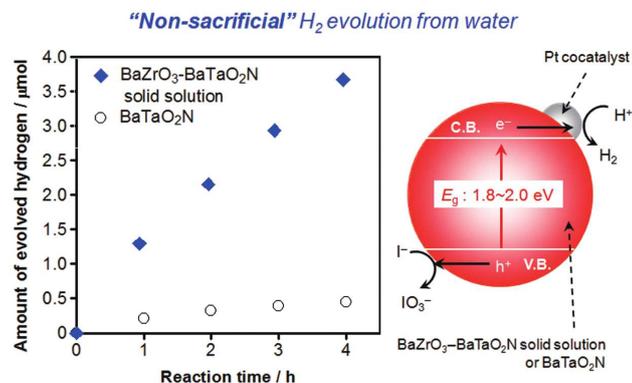


図 2. BaZrO₃ との固溶体形成による BaTaO₂N 光触媒の高活性化

き、これにより光触媒活性を向上させることにも成功した(*J. Catal.* 2014, 310, 67)。ひいては、2段階励起型水分解系の高性能化、さらには疑似太陽光照射下での水の完全分解も実証した(*ACS Catal.* 2013, 3, 1026)。

BaTaO₂N は水素生成反応に有効な光触媒として知られていたが、その酸素生成反応についてはほとんど報告が無く、活性はほぼゼロとされてきた。ところが、本研究を通じて得られた結晶学的に単一相の BaTaO₂N を用いると、適当な助触媒修飾により水の酸化に安定な光触媒となることがわかった(論文リスト 3)。また、BaZrO₃ との固溶体形成による活性向上も認められた。600 nm 以下の吸収端(2.0 eV 以上のバンドギャップ)をもつ材料で、水の酸化還元を両方達成した例は数多く知られているが、BaTaO₂N のような 2.0 eV 未満の小さなバンドギャップをもちながら水の酸化還元が行える材料はほとんどない。本系は、650 nm 以上の広域可視光を利用して水の酸化還元を単一の半導体光触媒で実証したはじめての例である(図 3)。

BaZrO₃-BaTaO₂N 及び BaTaO₂N が水の可視光酸化反応に活性な光触媒であることから、これらの材料が水の可視光分解用光電気化学セルのアノード材料として適用できることが強く示唆された。そこで、IrO₂ ナノ粒子を酸素生成助触媒として担持した BaZrO₃-BaTaO₂N を透明導電性ガラス基板上に固

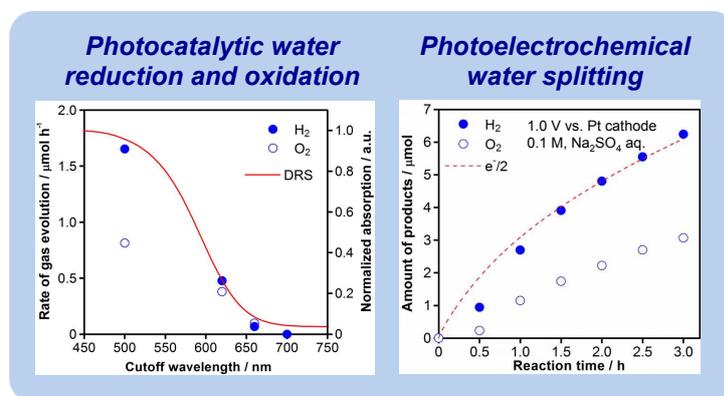


図 3. BaZrO₃-BaTaO₂N 固溶体を用いた水の酸化還元光触媒反応及び疑似太陽光照射下での光電気化学的水分解

定化し、Pt 線を対極とした 2 極式セルを組み、外部電圧 1 V を印加して疑似太陽光を照射すると、水素と酸素がほぼ化学量論的に生成することが確かめられた。上記の光触媒系への適用と同様、2.0 eV 未満のナローギャップ半導体を用いて水の理論電解電圧(1.23 V)以下の外部電圧印加により太陽光水分解を実証したのは、本研究が世界で最初の例となる(図 3)。

BaZrO₃-BaTaO₂N 固溶体に関する一連の研究で明らかとなった新たな問題点は、これらの材料の酸素生成活性が非常に低いということである。BaZrO₃-BaTaO₂N 固溶体の価電子帯上端は、水の酸化電位に対して 0.2~0.3 V 程度貴な位置にあることが光電気化学測定の結果から示唆されており、低い酸素生成活性のひとつの原因として、このようなバンド位置の問題に起因する反応駆動力の低さが考えられた(*J. Catal.* 2014, 310, 67)。このような事情から、BaTaO₂N 系光触媒の酸素生成活性を向上させることを試み、W(V)種のドーピングが有効であることを見出した(論文 4)。半導体光触媒の活性は、dⁿ (0 < n < 10)電子状態の金属カチオンをドーピングすると大きく低下するというのが経験的に知られていたが、本系は d¹ 電子状態の W(V)のドーピングにより活性が大きく向上する極めて珍しい事例である。

成果 C「ルチル型 TiO₂ 光触媒による水の完全分解及び格子欠陥密度-活性相関の解明」

上記の成果 A 及び B は、水の完全分解、とりわけ太陽光照射下で駆動する系の性能向上を強く意識したものである。その一方で、これらの酸窒化物系の新規材料は基礎的な物性面の

知見がほとんどなく、本研究で重要となる格子欠陥に関する理解も十分でないという問題があった。そこで、酸窒化物以外の材料系、具体的には基礎物性に関する知見が比較的豊富な金属酸化物に重点を置き、研究を進めた。

TiO₂は極めて研究例の多い代表的な半導体光触媒であり、アナタース型、ルチル型という2種類の代表的な結晶構造をもつ。これまでの研究でアナタース型 TiO₂ が飽和炭酸塩水溶液中など、特殊な条件下において水を水素と酸素に完全分解できることが報告されていたが、ルチル型での純水の完全分解の例は皆無だった。本研究では、ルチル型 TiO₂ に助触媒として少量の Pt を担持したものが、バンドギャップ励起によって純水を水素と酸素に完全分解することをはじめて明らかとした。これは、これまで顧みられることのなかったルチル型 TiO₂ がもつ特徴的な表面反応性、すなわち酸素の還元に対する低活性に着目して得られた成果である(論文リスト 1)。

ルチル型 TiO₂ を光触媒とした水の完全分解に関する研究を展開する中で、同じルチルでも試料によって水分解の活性に大きな差異があることを見出した。そこで、互いに同程度の比表面積をもち、水の完全分解に有利とされる結晶性のルチル型 TiO₂ 試料 2 種を対象として、種々の測定によって活性に差異が生じる原因を解明することを試みた。まず、これまで未検討事項となっていた光触媒粒子に含まれる格子欠陥密度と水分解活性の相関を明らかにするため、光音響分光法を用いてルチル型 TiO₂ 粒子に含まれる格子欠陥密度を定量した。意外なことに、見積もられた格子欠陥密度と水分解活性には相関が見られず、バルク全体の格子欠陥密度以外の因子が活性に大きく影響していることが示唆された。さらに詳細を検討した結果、活性を支配している因子のひとつは、表面近傍に存在する格子欠陥であり、それらが水の酸化過程を阻害していることを明らかとした。

3. 今後の展開

半導体光触媒による水の完全分解の高効率化に有効となる新たな指針の確立を目指し、光触媒粒子の表面に着目した研究を展開してきた。「表面欠陥の低減」が高効率化に対して本質的に重要であるという結論は、本研究で対象としてきた酸窒化物や酸化物に限った話ではなく、酸硫化物や硫化物、あるいは窒化物などにも適用できる可能性がある。その結果として、広範な無機半導体材料系に対して本研究で得られたエッセンスが役立つものと期待できる。

また、表面の反応性という観点からは、ルチル型 TiO₂ の水分解光触媒能を初めて明らかとした。表面の反応性は格子欠陥を含めた表面構造が大きく影響していると考えられるため、格子欠陥分布の空間分解も含めた更なる研究を展開する予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

「半導体光触媒による水分解活性の向上には表面の格子欠陥制御が重要」という考えに従い、約 3 年半に渡って研究を展開した。これが結果としてある程度正しかったことは、得られた成果が客観的に示すところであり、とりわけルチル型 TiO₂ を用いた研究では当該研究分野における未検討事項のひとつであった格子欠陥密度と水分解活性に関する定量的な知見を得ることができた。“半導体光触媒の表面”を切り口とした一連の研究を通じて、可視光による水の直接分解を可能にする新規光触媒系の構築、ナローギャップ半導体による太陽光エネルギー変換などを

達成し、人工光合成研究の分野においてある程度の成果を収めることができたと考えている。

しかしながら、研究期間内にもう少し何かできたのではないか？という思いは少なからずあり、全体としての研究の進め方やある大きな判断を迫られたときの展開力という点で己の能力の限界を感じることもあった。特に、ある光触媒系の性能向上を掲げた研究に注力した期間がやや長過ぎた印象があり、研究期間の後半にかけて行った基礎的研究に対して、皺寄せする結果になった感は否めない。反省点を挙げればキリがないが、本さきがけ研究期間の終了が新たな研究のスタートと捉え、本研究で得られた成果を糧にさらに研究を継続・発展させていきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

人工光合成の実現の本命とされている可視光を用いた半導体光触媒による水の完全分解、水素と酸素の生成は我が国の研究グループが世界を先導している。前田和彦博士は、その研究グループの一つに属し、研究展開の推進力となっている新進気鋭の研究者である。

さきがけ研究では半導体光触媒の反応効率を左右する最も重要な要因として、表面近傍の欠陥に着目した意欲的な研究提案を行い採択された。さきがけ研究以前の極めて精力的な研究展開の実績と期待に違わず、さきがけ研究開始と同時に、可視光感受性半導体光触媒系の開発と学理の解明に関して次々と極めてインパクトの高い研究成果を積み重ねている。前田博士の力強い研究推進は他のさきがけ研究者にも多大な感銘と影響を与えている。研究総括としては、めざましい研究成果を生み出す前田博士の独創性と粘り強い研究努力に敬意を表する。今後、人工光合成システム完成に向けて、いっそうの研究展開が大いに期待できるが、適切な時期に適切な研究支援が強く望まれる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Kazuhiko Maeda**,* “Direct splitting of pure water into hydrogen and oxygen using rutile titania powder as a photocatalyst” *Chem. Commun.* 2013, 49, 8404–8406.
2. **Kazuhiko Maeda**,* Daling Lu, Kazunari Domen, “Direct Water Splitting into Hydrogen and Oxygen under Visible Light by using Modified TaON Photocatalysts with a d^0 Electronic Configuration” *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 4986–4991.
3. **Kazuhiko Maeda**,* Daling Lu, Kazunari Domen, “Oxidation of Water under Visible-Light Irradiation over Modified BaTaO₂N Photocatalysts Promoted by Tungsten Species” *Angew. Chem., Int. Ed.* 2013, 52, 6488–6491.
4. **Kazuhiko Maeda**,* Kazunari Domen, “Water Oxidation Using a Particulate BaZrO₃-BaTaO₂N Solid-Solution Photocatalyst That Operates under a Wide Range of Visible Light” *Angew. Chem., Int. Ed.* 2012, 51, 9865–9869.
5. Su Su Khine Ma, **Kazuhiko Maeda**,* Kazunari Domen, “Modification of TaON with ZrO₂ to Improve Photocatalytic Hydrogen Evolution Activity under Visible Light: Influence of Preparation Conditions on Activity” *Catal. Sci. Technol.* 2012, 2, 818–823.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【国際会議 招待講演】

1. **Kazuhiko Maeda**, “Water splitting under visible light using modified oxynitride particles”, Symposium on the Fundamentals of Photocatalysis (July 11, 2011, Hefei National Laboratory for Physical Sciences at the Microscale, at the University of Science and Technology, China)
2. **Kazuhiko Maeda**, “Solar water splitting by modified oxynitride photocatalysts”, PCCP-MANA Symposium on Nanotechnology, Materials and Physical Chemistry (October 1, 2012, NIMS, Japan).
3. **Kazuhiko Maeda**, “Surface Modified Oxynitrides as Photocatalysts for Water Splitting under Visible Light”, The fifth World Hydrogen Technologies Convention (WHTC2013) (September 27, 2013, Shanghai, China).
4. **Kazuhiko Maeda**, “Semiconductor photocatalysts for visible-light water splitting: Structure and reaction mechanism”, 平成 25 年度 日本分光学会年次講演会 国際シンポジウム「分光学の太陽電池・天然／人工光合成への応用」(November 20, 2013, Osaka University, Japan).
5. **Kazuhiko Maeda**, “Visible-Light water splitting using modified oxynitride photocatalysts”, The 8th international conference on processing & manufacturing of advanced materials (December 4, 2013, Las Vegas, USA).

【国内学会 招待講演】

1. **前田 和彦**, “太陽光で水を分解して水素を製造する粉末光触媒の開発”, 応用物理学会シンポジウム「人工光合成」(2011 年 1 月 28 日, 東北大学東京分室)
2. **前田 和彦**, “水の可視光分解のための新規光触媒及び助触媒材料の開発”, 日本化学会第 94 春季年会 進歩賞受賞講演 (2014 年 3 月 29 日, 名古屋大学東山キャンパス).

【受賞】

1. 英国王立化学会, 第 6 回 PCCP Prize (2012 年 2 月 8 日)
2. 第 109 回触媒討論会優秀ポスター発表賞 (2012 年 4 月 2 日)
3. 日本化学会第 92 回春季年会, 優秀講演賞(学術)(2012 年 4 月 19 日)
4. 第 110 回触媒討論会若手優秀講演賞(2012 年 9 月 25 日)
5. 日本化学会第 63 回進歩賞 (2013 年 12 月 18 日)

【著作物】

1. **前田 和彦**, “第 11 章 人工光合成を目指した半導体光触媒の開発” 複合系の光機能研究会選書 2『金属錯体で創る人工光合成(仮)』 三共出版 執筆分担 (印刷中)

2. **前田 和彦**, “7-1 修飾型酸窒化物粉末を光触媒とした水の可視光分解”『人工光合成 - システム構築に向けての最新技術動向と展望』シーエムシー出版 執筆分担

【アウトリーチ活動】

1. サイエンス・カフェ「水と二酸化炭素が資源になる！～太陽光エネルギー利用に向けた化学の挑戦～」(2014年3月15日, 東京工業大学大岡山キャンパス)

研究報告書

「光化学的手法による天然有機色素の金属バインディング機能創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 村橋 哲郎

1. 研究のねらい

π -共役構造を持つ有機色素類は、その電子構造に起因する特徴的な機能を示すことから機能性分子を創出するための鍵となる物質群とみなされており、その性状解明を目指す研究が長年に渡り精力的におこなわれてきた。しかし、 π -共役系有機色素類の基本的機能のうち、金属バインド能については、高い潜在能力が期待できるにも関わらず、理解が進んでいない。本研究では、 π -共役系構造を持つ有機色素類の特異な金属バインド能を解明・実証することを最重要課題の一つとして位置づけ、特に、拡張された π -共役系構造を持つ有機色素類が、その π -共役電子を用いて多数の金属原子に π -配位し、金属クラスターをバインドする可能性に着目して研究を遂行した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、代表的な天然カロテノイド色素である β -カロテンが 10 核金属種をサンドイッチ型にバインドすることを明らかにした。この成果により、天然カロテノイド類が優れた多核金属バインダーとして働くことが初めて明らかになった。さらに、本研究では、人工系有機色素をバインダーとして持つモデル金属クラスターを用いて、レドックス機能解明に関する研究を進めた。その結果、拡張 π -共役系不飽和炭化水素と金属集合体のハイブリッド体が金属集合性の変化を伴う新しいタイプのレドックス応答性を示すことを見出した。

(2) 詳細

研究テーマA「天然カロテノイドの多核金属バインド能の実証」

長鎖 π -共役構造を持つ天然カロテノイド類は、生体中で色素、光捕集、抗酸化機能をはじめとする様々な働きを担うことから、有機材料化学、光化学、分子生物学などの様々な分野で広く研究されてきた。一方、天然カロテノイド類が、多数の金属をバインドする配位子として働くかどうかについては未解明であった。本研究では、カロテノイド類がその長い π -共役鎖上に複数の金属原子をバインドする能力を持つ可能性に着目し、これを実証することを目指して研究を進めた。代表的な天然カロテノイドである β -カロテンを用いて、金属クラスターのバインディングの可能性について実験検討をおこない、 β -カロテンが 10 核パラジウム鎖をサンドイッチ型にバインドすることを実証した(図1)。10 核パラジウム種のバインド反応は、加熱条件(60°C)で達成されるが、可視光照射下では室温で進行する。また、 β -カロテンは、10 核より少数核のパラジウムクラスターもバインドすることを明らかにした。少数核種については、10 核種からの脱メタル化法を新たに開発し、単一異性体として合成・単離した。 β -カロテンパラジウム複合体の光吸収スペクトルがバインドする核数に依存することも判明した。本結果により、天然カロテノイド類が優れた多核金属バインダーとして働くことが初めて明らかになった。

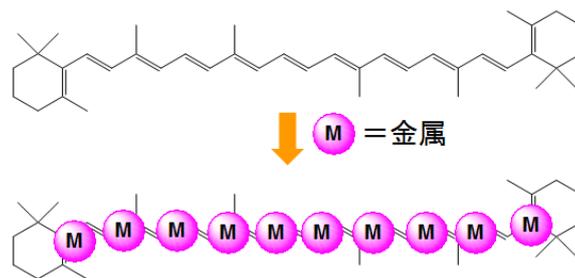


図1. 天然カロテノイドが多数の金属原子をバインドする能力を持つことを初めて実証した。 β -カロテンは最大で10個のパラジウム原子をバインドする。

人工系 π -共役不飽和炭化水素をバインダーとして持つ金属クラスターモデル分子を構築し、これを用いてバインダー交換反応の機構を解明する研究をおこなった。その結果、バインダー交換反応が2種類の速度論的中间体を経由する段階的機構を経て進行することを解明した。さらに、含ヘテロ原子芳香環を持つ天然有機色素が多種類知られていることを念頭に置き、含ヘテロ原子芳香族化合物や環状不飽和炭化水素類の金属クラスターバインド能についても検討を進め、新しい金属バインド様式を解明するとともに、混合金属種のバインドについても明らかにした(図2)。

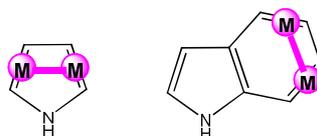


図2. アゾール類などのヘテロ芳香環や環状オレフィン類の金属バインド様式を明らかにした。

研究テーマB「有機色素にバインドされた金属クラスターの機能解明」

人工系 π -共役不飽和炭化水素をバインダーとして用いて構築した金属クラスターの機能解明に関する研究を進めた。その結果、4核パラジウム鎖化合物が従来にないタイプのレドックス応答性を示すことを発見した(図3)。即ち、拡張 π -共役系不飽和炭化水素に挟み込まれた金属集合体が、レドックスに反応して可逆的に分裂・集合する現象を示すことを発見・実証した(図3A)。さらに、平行に配置された共役系不飽和炭化水素バインダー間で、C-C結合形成・開裂がレドックスにより可逆的に進行することも見出した(図3B)。このような動的な構造変化を伴うレドックス挙動は、金属クラスター分子が多電子レドックス機能を発揮する際に重要な役割を果たす可能性がある。

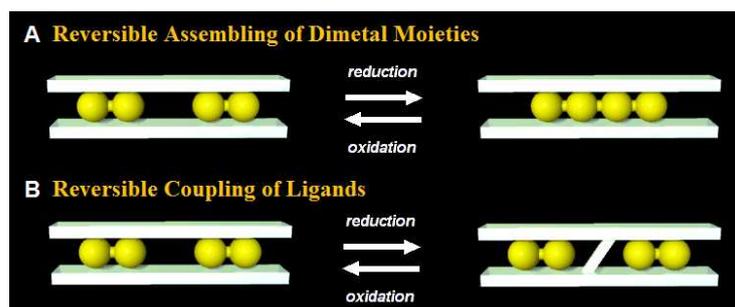


図3. 金属の分子内離散・集合をレドックスによりスイッチできることを発見した(様式A)。また、平行に配置されている共役系バインダー間での可逆的C-C結合形成・開裂をレドックスによりスイッチできることも見出した(様式B)。

3. 今後の展開

本研究で見出した有機色素類の金属バインディング能は、種々の有機色素類にも適用可能な高い一般性を持つと考えられる。拡張 π -共役骨格を持つ天然有機色素類およびその誘導体の種類は豊富にあり、たとえば鎖状 π -共役構造や環状構造、ヘテロ元素含有構造などが知られている。これらを多核バインダーとして用いるための手法開発が進むと予想される。また、有機色素類をバインダーとして用いることによって、巨大金属クラスターを安定化できる可能性がある。有機色素類をバインダーとして持つ金属クラスターの機能解明は、今後大きく進展していくと予想される。本研究の中で、特異なレドックス性質を明らかにしたが、今後もレドックス機能の解明が研究の焦点の一つになると考えられる。特に、多電子レドックス機能を引き出すことができれば、新たな触媒機能の開発に結びつくと期待される。 π -共役系有機色素と金属クラスターのハイブリッド構造由来の特徴を有効に引き出し、新しい物質変換につなげていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

本さきがけ研究では、拡張 π -共役系有機色素類の金属バインディング機能を解明することを主たる目的として研究をおこない、天然カロテノイドがその長い π -共役鎖を使って多数の金属原子をバインドする能力を持つことを初めて実証することができた。光照射により金属バインディングが促進される現象も見出し、光化学的手法の有用性も明らかにしている。また、人工系有機色素を用いたモデル化合物を使ってレドックス機能を探索し、有機色素間に挟み込まれた金属集合体が離散・集合現象を示すことを見出した。この現象は他の分子系では見出されていない新しい動的分子挙動であり、有機色素と金属集合体のハイブリッド体の特異な機能を持つことの一つの現れとみなせる。

以上のことから、当初の主要な計画目標は達成できたと考えている。本研究の中で天然有機色素類を金属クラスターの多座配位子として利用できることを示した意義は大きいと考えている。これまで、単核金属錯体については、種々の天然由来の分子およびそこから誘導される分子群が有用な配位子として働くことが確立されており、触媒の開発等に利用されてきた。一方、金属クラスター触媒に対しては有効でかつ入手容易な多座架橋配位子の開発が強く望まれてきた。

今回の成果は、天然有機色素類が金属クラスターに対する有用な多座架橋配位子として機能することを示すものであり、触媒として大きな期待がかかる金属クラスターに対する今後の分子設計に重要な指針を与えると期待される。

(2) 研究総括評価

物質科学のフロンティア領域の中でも、超分子系包接環境の科学、多電子変換系の科学、分子の構造変化が誘起する巨視的機能の科学、新しい原子集団形成と機能発現などは新領域として急速な進展が期待されている。

村橋哲郎博士は、新しい原子集団形成と機能発現のパイオニア研究者として有機化合物と金属原子の結合形成についての自身の卓越した研究実績を基礎に、 π -共役系有機色素類の金属バインド能に関する、意欲的な研究提案を行い採択された。

研究開始直後より、めざましい研究進展速度で π -共役系構造を持つ有機色素類の特異な金属バインド能の解明・実証を進めている。具体的には、代表的な天然カロテノイド色素である β -カロテンが10核金属種をサンドイッチ型にバインドすることを初めて明らかにした。さらに、人工系有機色素をバインダーとして持つモデル金属クラスターを用いて、レドックス機能解明に関する研究を進め、拡張 π -共役系不飽和炭化水素と金属集合体のハイブリッド体が金属集合性の変化を伴う新しいタイプのレドックス応答性を示すことを見出した。即ち、拡張 π -共役系不飽和炭化水素に挟み込まれた金属集合体が、レドックスに反応して可逆的に分裂・集合する現象を示すことを発見している。

このような矚目すべき研究展開はさきがけ研究者に望まれるフルスイングによる研究挑戦の模範例とも言える。一方で、人工光合成の実現には、多電子変換過程をいかにして制御し効率的なシステムを構築できるかが解決すべきボトルネック課題の一つである。村橋博士には、今後、この多電子変換過程の科学について正面からの挑戦を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表(8件中主要5件)

1. Murahashi, T.; Usui, K.; Inoue, R.; Ogoshi, S.; Kurosawa, H. "Metallocenoids of Platinum": Syntheses and Structures of Triangular Triplatinum Sandwich Complexes of Cycloheptatrienyl" Murahashi, T.; Usui, K.; Inoue, R.; Ogoshi, S.; Kurosawa, H. *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 117-122.
2. Murahashi, T.; Takase, K.; Oka, M.; Ogoshi, S. "Oxidative Dinuclear Addition of a $\text{Pd}^{\text{I}}\text{-Pd}^{\text{I}}$ Moiety to Arenes: Generation of $\mu\text{-}\eta^3\text{:}\eta^3\text{-arene Pd}^{\text{II}}_2$ Species" *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14908-14911.
3. Murahashi, T.; Usui, K.; Tachibana, Y.; Kimura, S.; Ogoshi, S. "Selective Construction of Pd_2Pt and PdPt_2 Triangles in a Sandwich Framework: Carbocyclic Ligands as Scaffolds for a Mixed Metal System" *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 8886-8890.
4. Murahashi, T.; Shirato, K.; Fukushima, A.; Takase, K.; Suenobu, T.; Fukuzumi, S.; Ogoshi, S.; Kurosawa, H. "Redox-induced Reversible Metal Assembly through Translocation and

Reversible Ligand Coupling in Tetranuclear Sandwich Frameworks” *Nature Chem.* **2012**, *4*, 52.

5. Murahashi, T.; Kimura, S.; Takase, K.; Ogoshi, S.; Yamamoto, K. “Bridging π -Coordination of Pyrrole and Indole over a Pd^I-Pd^I Bond” *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 4310–4312.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

A. 国際学会招待講演(9件)

1. Murahashi, T. “Chemistry of Multinuclear Metal Sandwich Complexes” Osaka University Global COE International Symposium, Invited Speaker, 2010/10/22 (Osaka, Japan)
2. Murahashi, T. “Multinuclear Sandwich Complexes Containing a Metal Chain or a Metal Sheet between Extended Unsaturated Hydrocarbons” Dalton Lecture, Japan Society of Coordination Chemistry Annual Meeting, Award Lecture, 2011/9/17 (Okayama, Japan)
3. Murahashi, T. “Chemistry of Multinuclear Sandwich Complexes” Dalton Lecture, Award Lecture, 2011/9/30 (Taipei, Republic of China)
4. Murahashi, T. “Redox-Switchable Metal Assembling and Ligand Coupling in Tetranuclear Palladium Sandwich Frameworks” The 9th Japan-China Joint Symposium on Metal Cluster Compounds, Invited Speaker, 2012/8/15 (Fukuoka, Japan)
5. Murahashi, T. “Chemistry of Dimensionally Extended Sandwich Compounds” RIKEN International Symposium on Frontiers of Organometallic Chemistry, Invited Speaker, 2012/11/30 (Wako, Japan)
6. Murahashi, T. “Redox-Switchable Metal Assembling and Ligand Coupling in Tetranuclear Palladium Sandwich Frameworks”, The 6th Japan-China Joint Symposium on Functional Supramolecular Architectures, Invited Speaker, 2013/1/20 (Okazaki, Japan)
7. Murahashi, T. “Dynamic Structural Changes of Multinuclear Sandwich Complexes”, Japan-China Joint Symposium for Coordination Nanomaterials, Invited Speaker, 2013/6/14 (Okazaki, Japan)
8. Murahashi, T. “Chemistry of Metal Chain Sandwich Complexes”, Japan-Canada Joint Symposium for Coordination Chemistry, Invited Speaker, 2013/11/1 (Naha, Japan)
9. Murahashi, T. “Dynamic Structural Changes in Multinuclear Sandwich Complexes”, Japan Society of Coordination Chemistry Annual Meeting, Invited Speaker, 2013/11/2 (Okinawa, Japan)

B. 国内学会招待講演(11件)

1. 村橋哲郎、「多核サンドイッチ錯体の構築～不飽和炭化水素類の鋳型効果」, 近畿化

- 学協会有機金属部会第3回例会, 2010/11/19(金沢、石川)
2. 村橋哲郎、「サンドイッチ化合物の構造次元性拡張」, 分子科学研究所所長招聘研究会, 2011/3/3(岡崎、愛知)
 3. 村橋哲郎、「サンドイッチ化合物の構造次元性拡張」, 名古屋大学 GCOE シンポジウム, 2011/10/22
 4. 村橋哲郎、「金属鎖および金属シートを持つサンドイッチ化合物の創製」, 東京大学大学院工学研究科応用化学談話会, 2012/3/3(東京)
 5. 村橋哲郎、「サンドイッチ化合物の新展開」, 分子研研究会, 2012/3/13(岡崎、愛知)
 6. 村橋哲郎、「サンドイッチ化合物の化学—単核から多核への展開」, 東京工業大学理工学研究科応用化学専攻セミナー, 2012/11/7
 7. 村橋哲郎、「サンドイッチ化合物の構造次元性拡張」, 第 43 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 2012/11/11(名古屋)
 8. 村橋哲郎、「有機金属錯体の構造次元性拡張」, 分子研研究会, 2013/1/19(岡崎、愛知)
 9. 村橋哲郎、「金属鎖および金属シートを持つサンドイッチ化合物の創製と性状解明」, 東北大学卓越大学院研究会, 2013/2/6(仙台)
 10. 村橋哲郎、「炭素 π —共役系と金属クラスターの間に形成される柔軟な連続多点配位結合」, 第 93 日本化学会春季年会、2013/3/23(滋賀)
 11. 村橋哲郎、「金属鎖および金属シートを持つサンドイッチ化合物の創製」、新学術領域研究会「メゾスコピックアーキテクチャーの化学」, 2013/5/1(東京)